



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 05 de Agosto del 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Jerson Estiven Anzola González, con C.C. No. 1.075.299.589 de Neiva,

Lina Marcela Rojas Motta, con C.C. No. 1.083.927.300 de Pitalito.

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado: AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Y SU EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA *Salmonella enteritidis*. Presentado y aprobado en el año 2022 como requisito para optar al título de:

Licenciados en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: *Lina Marcela Rojas Motta*

Firma:



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Aislamiento, Caracterización de la Composición Química de los Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) y su Evaluación como Agentes Antimicrobianos contra *Salmonella enteritidis*.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Ánzola González	Jerson Estiven
Rojas Motta	Lina Marcela

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gómez	Jhon Fredy

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gómez	Jhon Fredy
Sánchez Ramírez	Nina María

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2022

NÚMERO DE PÁGINAS: 151

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas Fotografías Grabaciones en discos ___ Ilustraciones en general Grabados ___ Láminas ___
Litografías ___ Mapas ___ Música impresa ___ Planos ___ Retratos ___ Sin ilustraciones ___ Tablas o Cuadros

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:



CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 3
--------	--------------	---------	---	----------	------	--------	--------

MATERIAL ANEXO: Ninguno

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria): Meritoria

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

<u>Español</u>	<u>Inglés</u>	<u>Español</u>	<u>Inglés</u>
1. <u>Siparuna gesnerioides</u>	<u>Siparuna gesnerioides</u>	6. <u>Halos de Inhibición</u>	<u>Inhibition Halos</u>
2. <u>Aceites Esenciales</u>	<u>Essential Oils</u>	7. <u>Ampicilina</u>	<u>Ampicillin</u>
3. <u>Antimicrobiana</u>	<u>Antimicrobial</u>	8. <u>Frutas</u>	<u>Fruits</u>
4. <u>Salmonella enteritidis</u>	<u>Salmonella enteritidis</u>	9. <u>Compuestos</u>	<u>Compounds</u>
5. <u>Caracterización</u>	<u>Characterization</u>	10. <u>Hidrodestilación</u>	<u>Hydrodistillation</u>

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Siparuna gesnerioides (Kunth) pertenece a la familia *Siparunaceae*, (género *Siparuna*) de la cual se conocen varios referentes etnobotánicos en Latinoamérica por sus propiedades ansiolíticas, antioxidantes, antimicrobiana, entre otros. En Colombia no se han reportado estudios para esta especie, siendo nativa de la región del Huila. Su aroma característico fue de interés en el desarrollo de esta propuesta de investigación, que consistió en el aislamiento de sus aceites esenciales mediante tres métodos: Hidrodestilación simple (HD), Arrastre con vapor de agua (SD) e Hidrodestilación asistida por microondas (MWHd); presentando mejor rendimiento con la técnica MWHd, en comparación con la técnica SD. Mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificaron 46 compuestos de naturaleza: cetónica, ácidos, alcoholes y sesquiterpenos como lo son (+) -Espatulenol, 10-epi-elemol, Nerolidol, Mircenol, 2-Decanona, el Hidroperóxido de terc-butilo y el α -Bisabolol; evaluados para determinar su potencial antimicrobiano contra *Salmonella enteritidis* a diferentes concentraciones. Las bacterias se inocularon en Agar TSA y medios con diferentes pulpas de frutas. La actividad antimicrobiana de los AE de *S. gesnerioides* (Kunth) demostraron inhibición contra *Salmonella enteritidis* en todas las concentraciones. La presencia de los halos inhibitorio de mayor medida se presentó en concentraciones de 5000 y 50000 ppm con una medida de 2,0559 mm ($\pm 0,8841$) y 2,9719mm ($\pm 1,2574$) respectivamente, para la concentración de 1000 ppm un halo de inhibición de 1,7149 mm ($\pm 0,3483$); para el AE en estado puro un valor de 6,6887 mm ($\pm 0,0679$); esto en comparación con la ampicilina (control positivo) empleado en este estudio.



ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Siparuna gesnerioides (Kunth) belongs to the family Siparunaceae, (genus Siparuna) of which several ethnobotanical references are known in Latin America for its anxiolytic, antioxidant and antimicrobial properties, among others. In Colombia no studies have been reported for this species, being native to the Huila region. Its characteristic aroma was of interest in the development of this research proposal, which consisted in the isolation of its essential oils by three methods: simple hydrodistillation (HD), steam distillation (SD) and microwave-assisted hydrodistillation (MWHD); presenting better performance with the MWHD technique, compared to the SD technique. By means of gas chromatography coupled to mass spectrometry, 46 compounds of ketone, acids, alcohols and sesquiterpenes such as (+)-Espatulenol, 10-epi-elemol, Nerolidol, Myrcenol, 2-Decanone, tert-butyl hydroperoxide and α -Bisabolol were identified and evaluated to determine their antimicrobial potential against Salmonella enteritidis at different concentrations. The bacteria were inoculated on TSA Agar and media with different fruit pulps. The antimicrobial activity of S. gesnerioides (Kunth) EOs showed inhibition against Salmonella enteritidis at all concentrations. The presence of the inhibitory halos of greater measure was presented in concentrations of 5000 and 50000 ppm with a measure of 2.0559 mm (± 0.8841) and 2.9719mm (± 1.2574) respectively, for the concentration of 1000 ppm an inhibition halo of 1.7149 mm (± 0.3483); for the EO in pure state a value of 6.6887 mm (± 0.0679); this in comparison with ampicillin (positive control) used in this study.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre presidente Jurado: PhD. Jhon Fredy Castañeda Gómez

Firma:

Nombre Jurado: Dr. Andres Mauricio Rojas Sepúlveda

Firma:

Nombre Jurado: Dr (c). Jorge Ivan Sierra Acevedo

Firma:

Jorge Iván Sierra Acevedo



UNIVERSIDAD

SURCOLOMBIANA

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN
QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Y
SU EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA
Salmonella enteritidis.**

**Jerson Estiven Anzola González
Lina Marcela Rojas Motta**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN CIENCIAS NATURALES FÍSICA,
QUÍMICA Y BIOLOGÍA
NEIVA, 2022**

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN
 QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Y
 SU EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA
 Salmonella enteritidis.**

Trabajo de grado para obtener el título de:
Licenciado(a) en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Jerson Estiven Anzola González

Cod. 20162150994

Lina Marcela Rojas Motta

Cod. 20162150300

**Grupo Químico de Investigación y Desarrollo Ambiental (QUIDEA)
Semillero de Química de la Universidad Surcolombiana (SIQUS)**

Asesores

Jhon Fredy Castañeda Gómez

Nina María Sánchez Ramírez

Neiva, Huila, Colombia

Agosto de 2022

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN
QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Y
SU EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA
Salmonella enteritidis.**

Por:
Jerson Estiven Anzola González
Lina Marcela Rojas Motta

Aprobado por los Jurados:



Dr(c) Q. Jorge Iván Sierra Acevedo



Dr. Q. Andrés Mauricio Rojas Sepúlveda

Neiva, 05 de Agosto de 2022

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada:

A mi madre Luz Mery González, gracias a su esfuerzo y apoyo incondicional me han permitido culminar esta etapa tan importante en mi proyecto de vida, doy gracias por inculcar un sin número de valores en mí; a mis compañeras (o) y maestros por su compañía, sus consejos y apoyo absoluto.

Jerson Estiven Anzola González

A Dios y a mis padres Leónidas Rojas y Consuelo Motta por ser mi constante apoyo incondicional, por su gran amor y esfuerzo, por ser el motor de mi vida, a mi hermano y mis abuelos por sus palabras de aliento y apoyo; a mis amigos y asesores por sus consejos y apoyo absoluto. Por último, quiero dedicarlo especialmente a la memoria de mi tío José Vicente Rojas que desde el cielo me acompaña hoy y siempre.

Lina Marcela Rojas Motta.

AGRADECIMIENTOS

A los asesores de este trabajo de grado: profesor Jhon Fredy Castañeda Gómez por el apoyo, estímulo y compañía para la realización de este trabajo de grado y a la profesora Nina María Sánchez Ramírez por su acompañamiento constante, su asesoría y colaboración durante el desarrollo de este proyecto.

Al herbario Surco perteneciente a la Universidad Surcolombiana y a su directora Bióloga Hilda del Carmen Dueñas por su colaboración en el proceso de identificación de la especie vegetal *Siparuna gesnerioides* (Kunth).

A la Lic. Yeimis Yoana Montealegre Figueroa y a la Auxiliar Mayra Alejandra Garzón, encargadas de la coordinación del laboratorio de Química de Ciencias Básicas de la Universidad Surcolombiana, por permitir el desarrollo metodológico durante la ejecución del proyecto.

A la profesora Paula Andrea Charry Sánchez perteneciente al programa de Química de la Universidad del Quindío por el registro CG-MS de las muestras del Aceite Esencial en el laboratorio de análisis instrumental.

A la Microbióloga Bibian Katherine Argüello Bernal encargada del laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Surcolombiana, por su apoyo y colaboración durante la realización de las pruebas biológicas.

Al programa *Gestores de conocimiento, ciencia tecnología e innovación* de la gobernación del Huila en asociación con la Universidad CORHUILA por el apoyo financiero durante la ejecución de este proyecto, así como a la despulpadora Archila por su contribución al desarrollo de la evaluación biológica de los AE de *Siparuna gesnerioides* Kunth contra la cepa bacteriana *Salmonella enteritidis*.

A los jurados Mq., Jorge Ivan Sierra Acevedo y el Doc. Andrés Mauricio Rojas Sepúlveda agradecemos por su seguimiento, comentarios y contribución al presente trabajo.

Tabla de contenido

<i>Lista de Tablas</i>	9
<i>Lista de ilustraciones</i>	11
<i>Resumen</i>	17
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
II. JUSTIFICACIÓN	23
III. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo General	29
3.2. Objetivos Específicos	29
IV. MARCO TEÓRICO	30
4.1. Generalidades de la Familia Siparunaceae	30
4.2. Género Siparuna	31
4.3. Siparuna gesnerioides (Kunth) A. DC.	32
4.4. Generalidades de la Familia Enterobacteriaceae	33
4.5. Género Salmonella	33
4.6. Antecedentes	34
4.6.1.1. 4.6.1. Internacionales.	34
4.6.1.2. 4.6.2. Perspectiva de investigaciones con indicaciones clínicas.....	38
4.6.1.3. 4.6.3. Nacionales y Regionales.	39
4.6.1.4. 4.6.4. Institucionales.	40
4.6.1.5. 4.6.5. Algunos estudios con aceites de <i>Siparuna</i>	40
4.6.1.6. 4.6.6. Revisión general de compuestos en varias especies de <i>Siparunaceae</i> . 43	
4.7. Referentes Conceptuales	43
4.7.1.1. 4.7.1. Aceites Esenciales.....	43
4.8. Métodos de Análisis Instrumental	44
4.8.1.1. 4.8.1. Cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS)	45
4.9. Métodos de Extracción de Aceites Esenciales	47
4.9.1.1. 4.9.1. Destilación por arrastre con vapor de agua (SD).....	47
4.9.1.2. 4.9.2. Hidrodestilación (HD)	47
4.9.1.3. 4.9.3. Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD) 48	
4.10. Evaluación Biológica	48
4.10.1.1. 4.11.1. Método de difusión	49
4.10.1.2. 4.11.2. Escala de McFarland.....	50

V. METODOLOGÍA.....	51
5.1. Enfoque Metodológico.....	51
5.2. Colecta del Material Vegetal.....	55
5.3. Preparado del Material	56
5.4. Métodos de Extracción	56
5.4.1.1. 5.4.1 Hidrodestilación Simple (HD).....	57
5.4.1.2. 5.4.2 Hidrodestilación por Arrastre con Vapor de Agua (SD)	59
5.4.1.3. 5.4.3 Hidrodestilación Asistida con Microondas (MWH).....	60
5.5. Rendimiento	61
5.6. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (CG-MS).....	62
5.7. Ensayos Biológicos	63
5.7.1. Preparación de los aceites esenciales.....	63
5.7.2. Preparación de Medios de Cultivo.....	64
5.7.2.1. Agar TSA.....	64
5.7.2.2. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta sin Manipulación Previa	66
5.7.2.3. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta con Manipulación Previa (DESPULPADORA ARCHILA)	70
5.7.2.4. Agar Nutritivo.....	73
5.7.3. Preparación del Material para Pruebas Antimicrobianas.....	74
5.7.4. Preparación del Inoculo	75
5.7.5. Estandarización del Inoculo.....	76
5.7.6. Siembra de la Cepa Bacteriana <i>Salmonella enteritidis</i>	77
5.7.7. Pruebas de Sensibilidad Microbiana.....	78
5.7.8. Observación de Resultados de las Pruebas de Sensibilidad	82
5.7.9. Software “ImageJ”	83
VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	84
6.1. Rendimiento de los Aceites Esenciales de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth). 84	
6.2. Características Organolépticas de los Aceites.....	85
6.3. Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas de los Aceites Esenciales <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth).	88
6.3.1. Cromatograma de gases CG-MS del aceite esencial de las hojas de <i>S. gesnerioides</i> (Kunth) por Hidrodestilación (HD).	89
6.3.1.1. 2-Decanona	91
6.3.2. Cromatograma CG-MS del aceite esencial de los tallos secos de <i>S. gesnerioides</i> (Kunth) por Hidrodestilación (HD).	94
6.3.2.1. Hidroperóxido de ter-butilo (TBHP)	97

6.3.3. Cromatograma de gases GC-MS del AE de las hojas secas de <i>S. gesnerioides</i> (Kunth) por Arrastre con Vapor de Agua (SD)	99
6.3.3.1. (+)-Espatulenol	102
6.3.3.2. 10-epi-elemol	105
6.3.3.3. Nerolidol	108
6.3.3.4. Mircenol	111
6.3.4. Cromatograma de gases CG-MS del AE de los Tallos secos de <i>S. gesnerioides</i> (Kunth) por Arrastre con Vapor de Agua (SD).	113
6.3.5. Cromatograma de gases GC-MS del AE de los tallos secos de <i>S. gesnerioides</i> (Kunth) por Hidrodestilación asistida por Microondas (MWHD). ..	116
6.4. Ensayos Biológicos	118
6.4.1. Agar TSA	119
6.4.1.1. 6.4.2. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta con Manipulación Previa (DESPULPADORA ARCHILA)	121
6.4.3. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta sin Manipulación Previa	127
VII. CONCLUSIONES.....	133
VIII. RECOMENDACIONES.....	135
IX. REFERENCIAS	136
X. ANEXOS	150

Lista de Tablas

Capítulo V

Tabla 1 Naturaleza de las variables asignadas en este estudio Ríos y Rojas (2017)	52
Tabla 2 pH del extracto de pulpa de Melón (<i>Cucumis melo</i>)	67
Tabla 3 pH del extracto de pulpa de Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	68
Tabla 4 pH del extracto de pulpa de Papaya (<i>Carica papaya</i> L).....	69
Tabla 5 pH del extracto de pulpa del Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)	71
Tabla 6 pH del extracto de pulpa de Guanábana (<i>Annona muricata</i>)	72
Tabla 7 pH del extracto de pulpa de Fresa (<i>Fragaria vesca</i>).....	73

Capítulo VI

Tabla 8 Comparación del rendimiento de los AE de material seco de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) con el método de obtención.	84
Tabla 9 Composición química del AE de las Hojas de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por el método de hidrodestilación.....	90
Tabla 10 Composición química del AE de los Tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por el método de hidrodestilación.....	94
Tabla 11 Composición química del AE de las Hojas de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por el método de Arrastre con Vapor de Agua.	99
Tabla 12 Composición química del AE de Tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por el método de Arrastre con Vapor de Agua.	114
Tabla 13 Composición química del AE de los Tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por el método de Hidrodestilación asistida por Microondas	117
Tabla 14 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar TSA.....	119
Tabla 15 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>).....	121

Tabla 16 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Guanábana (<i>Annona muricata</i>).	123
Tabla 17 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Fresa (<i>Fragaria vesca</i>).	125
Tabla 18 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Melón (<i>Cucumis melo</i>).	127
Tabla 19 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).	129
Tabla 20 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para <i>Salmonella enteritidis</i> con los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Papaya (<i>Carica papaya L</i>).	131

Lista de ilustraciones

Capítulo IV

Ilustración N° 1 <i>Siparuna sessiliflora</i> (Kunth) A. DC.	30
Ilustración N° 2 <i>Siparuna thecaphora</i> (Poepp. & Endl.) A. DC.	31
Ilustración N° 3 Estructuras aéreas de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) A. DC. (Hojas, Frutos, Inflorescencia)	32
Ilustración N° 4 Antibiograma mediante técnica Kirby-bauer en el que se observa la presencia de halos de inhibición.	49
Ilustración N° 5 Estandarización del inóculo mediante el uso de la tarjeta de wickerham.	50

Capítulo V

Ilustración N° 6 Diseño experimental para la obtención de los AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth).....	54
Ilustración N° 7 Identificación morfológica en campo de la especie <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) en el corregimiento de Vegalarga – Huila.	55
Ilustración N° 8 Preparación del material vegetal, separación de estructuras y proceso de pulverización.....	56
Ilustración N° 9 Montaje experimental para la obtención de AE por medio del método de HD.....	57
Ilustración N° 10 Montaje extracción líquido-líquido, secado de fase orgánica y rotoevaporación..	58
Ilustración N° 11 Montaje experimental para la obtención del AE por medio del método de SD.....	59
Ilustración N° 12 Montaje para la hidrodestilación simple asistida con microondas.....	60
Ilustración N° 13 Proceso de selección de rendimiento	61
Ilustración N° 14 Preparación del medio de cultivo Agar TSA	65
Ilustración N° 15 Medios de cultivo servidos de TSA	66

Ilustración N° 16 Preparación del extracto de Melón (<i>Cucumis melo</i>) y preparación del medio	66
Ilustración N° 17 Medición de pH pulpa de Melón (<i>Cucumis melo</i>)	67
Ilustración N° 18 Preparación del extracto del Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) y preparación del medio.....	68
Ilustración N° 19 Medición de pH de la pulpa de Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	69
Ilustración N° 20 Preparación del extracto de Papaya (<i>Carica papaya L</i>) y preparación del medio.....	69
Ilustración N° 21 Medición de pH pulpa de Papaya (<i>Carica papaya L</i>).....	70
Ilustración N° 22 Extracto de Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) y preparación del medio ...	70
Ilustración N° 23 Medición de pH de Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)	71
Ilustración N° 24 Preparación del extracto de Guanábana (<i>Annona muricata</i>) y preparación del medio.....	71
Ilustración N° 25 Medición de pH de Guanábana (<i>Annona muricata</i>).....	72
Ilustración N° 26 Preparación del extracto de Fresa (<i>Fragaria vesca</i>) y preparación del medio	72
Ilustración N° 27 Medición de pH del extracto de fresa (<i>Fragaria vesca</i>)	73
Ilustración N° 28 Medios de cultivos listos para siembra	73
Ilustración N° 29 Medio de cultivo Agar Nutritivo	74
Ilustración N° 30 Preparación previa del material antes del proceso de esterilización ...	75
Ilustración N° 31 Proceso de Esterilización de los medios de cultivo y el material de laboratorio.....	75
Ilustración N° 32 Preparación y siembra de la cepa bacteriana Salmonella enteritidis en placa y bisel.	76
Ilustración N° 33 Proceso de estandarización de la cepa bacteriana Salmonella enteritidis	77
Ilustración N° 34 Preparación del estándar 0,5 de McFarland	77
Ilustración N° 35 Siembra del inóculo de Salmonella enteritidis en placas	78

Ilustración N° 36 Medios de cultivos con <i>Salmonella enteritidis</i> y disoluciones de AE de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth).....	79
Ilustración N° 37 División de las placas por cuadrantes.	79
Ilustración N° 38 Placa con controles positivo y negativo	79
Ilustración N° 39 Impregnación de sensidiscos con AE.....	80
Ilustración N° 40 Placas con AE Puro (Tallos) por HD.	80
Ilustración N° 41 Placas con AE Puro (Hojas) por HD.....	81
Ilustración N° 42 Placas con AE Puro (Tallos) por SD.....	81
Ilustración N° 43 Placas con AE Puro (Tallos) por MWHD.....	82
Ilustración N° 44 Proceso de Incubación de <i>Salmonella enteritidis</i> en diversos medios de cultivo	82
Ilustración N° 45 Software “J Image”	83

Capítulo VI

Ilustración N° 46 Aceite Esencial de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) (Tallos). Técnica HD.....	86
Ilustración N° 47 Aceite Esencial de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) (Hojas). Técnica HD.....	86
Ilustración N° 48 Aceite Esencial de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) (Hojas). Técnica SD	86
Ilustración N° 49 Aceite Esencial de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) (Tallos). Técnica SD	86
Ilustración N° 50 Aceite Esencial de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) (Tallos). Técnica MWHD	87
Ilustración N° 51 Aceite Esencial de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) (Hojas). Técnica MWHD	87
Ilustración N° 52 Aceites Esenciales de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth).....	88
Ilustración N° 53 Aceites Esenciales de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) Partes Aéreas (Hojas)	88

Ilustración N° 54 Aceites Esenciales de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) Partes Aéreas (Tallos).....	88
Ilustración N° 55 Cromatograma CG-MS del aceite esencial de las hojas de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por HD	89
Ilustración N° 56 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS del aceite esencial de las hojas de <i>Siparuna gesnerioides</i> por HD	91
Ilustración N° 57 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de 2-Decanona obtenidos por medio de ChemDraw	92
Ilustración N° 58 Espectro de masas experimental para la 2-Decanona presente en el AE de <i>S. gesnerioides</i>	92
Ilustración N° 59 Espectro de Masas Teórico de la 2-Decanona arrojado por la librería NIST11s.lib.....	93
Ilustración N° 60 Cromatograma CG-MS del aceite esencial de los tallos secos de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth). por HD.....	94
Ilustración N° 61 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los Tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> por HD.....	95
Ilustración N° 62 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los Tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> por HD.....	96
Ilustración N° 63 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de Hidroperóxido de terc-butilo obtenidos por medio de ChemDraw	97
Ilustración N° 64 Espectro de masas experimental para el Hidroperóxido de terc-butilo presente en el AE de <i>S. gesnerioides</i>	98
Ilustración N° 65 Espectro de masas teórico del Hidroperóxido de terc-butilo.	98
Ilustración N° 66 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de las hojas de la <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por SD.....	99
Ilustración N° 67 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de las hojas de <i>Siparuna gesnerioides</i> por SD	101
Ilustración N° 68 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de (+) - Espatulanol por medio de ChemDraw	102

Ilustración N° 69 Espectro de masas experimental para el (+)-Espatulenol presente en el AE de <i>S. gesnerioides</i>	103
Ilustración N° 70 Espetro de Masas teórico para el Espatulenol.	103
Ilustración N° 71 Propuesta de fragmentación para la molécula de Espatulenol.	105
Ilustración N° 72 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de 10-epi- elemol obtenidos por medio de ChemDraw	106
Ilustración N° 73 Espectro de masas experimental para el 10-epi- elemol presente en el AE de <i>S. gesnerioides</i>	107
Ilustración N° 74 Espectro teórico del 10-Epi- elemol contenido en la biblioteca NIST11s.lib del equipo de espectrometría de masas.	107
Ilustración N° 75 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de Nerolidol obtenidos por medio de ChemDraw	108
Ilustración N° 76 Espectro de masas experimental para el Norelidol (Z) presente en el AE de <i>S. gesnerioides</i>	109
Ilustración N° 77 Espectro teórico del Norelidol (Z) contenido en la biblioteca NIST11s.lib del equipo de espectrometría de masas.	109
Ilustración N° 78 Propuesta de fragmentación para el E-Nerolidol. Modificada de Guerrero, (2008).	110
Ilustración N° 79 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula del Mircenol obtenidos por medio de ChemDraw	111
Ilustración N° 80 Espectro de masas experimental para el Mircenol presente en el AE de <i>S. gesnerioides</i>	112
Ilustración N° 81 Espectro teórico del Mircenol contenido en la biblioteca NIST11s.lib del equipo de espectrometría de masas.	113
Ilustración N° 82 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de las Ramas de la <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por SD	114
Ilustración N° 83 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> por SD	115

Ilustración N° 84 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> por SD	116
Ilustración N° 85 Cromatograma CG-MS del AE de los Tallos de <i>Siparuna gesnerioides</i> (Kunth) por MWHD	117
Ilustración N° 86 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar TSA para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	120
Ilustración N° 87 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	122
Ilustración N° 88 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Guanábana (<i>Annona muricata</i>) para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	124
Ilustración N° 89 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Fresa (<i>Fragaria vesca</i>) para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	126
Ilustración N° 90 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Melón (<i>Cucumis melo</i>) para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	128
Ilustración N° 91 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	130
Ilustración N° 92 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Papaya (<i>Carica papaya L</i>) para el patógeno <i>Salmonella enteritidis</i>	131

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN
QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Y
SU EVALUACIÓN COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS CONTRA
Salmonella enteritidis.**

Resumen

Siparuna gesnerioides (Kunth) pertenece a la familia *Siparunaceae*, (género *Siparuna*) de la cual se conocen varios referentes etnobotánicos en Latinoamérica por sus propiedades ansiolíticas, antioxidantes, tripanocida, antimicrobiana, antitumoral y antiofídica. Cabe resaltar que, en Colombia no se han reportado estudios para esta especie, siendo nativa de la región del Huila. Su aroma característico fue de interés en el desarrollo de esta propuesta de investigación, consistió en el aislamiento de los aceites esenciales de sus hojas y tallos, por tres métodos: Hidrodestilación simple (HD), Arrastre con vapor de agua (SD) e Hidrodestilación asistida por microondas (MWHD); presentando el mejor rendimiento con la técnica MWHD, en comparación con la técnica SD en hojas. Los aceites esenciales fueron caracterizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de su composición química, encontrándose los siguientes compuestos: cetonas, ácidos, alcoholes y sesquiterpenos como (+) -Espatulenol, 10-epi-elemol, Nerolidol, Mircenol, 2-Decanona, el Hidroperóxido de terc-butilo y el α -Bisabolol. Se realizó evaluación para determinar su potencial antimicrobiano contra cepas de *Salmonella enteritidis* a 5000 ppm, 10000 ppm, 50000 ppm, y en su forma intacta, ya que es una bacteria que se encuentra entre las cuatro primeras causas de enfermedades diarreicas en el mundo, presente en los alimentos como carnes (pollo), vegetales y frutas (irrigación de cultivos con agua contaminada). El crecimiento bacteriano se realizó en medio de cultivo TSA y en un medio con pulpa de diferentes frutas (Maracuyá, Fresa, Guanábana, Melón, Papaya y Tomate). Tres de las seis pulpas de frutas empleadas fueron manipuladas con anterioridad por el personal de la despulpadora Archila quienes donaron el producto y las otras tres pulpas fueron adquiridas de manera comercial. La actividad antimicrobiana

de los AE de *S. gesnerioides* (Kunth) demostraron inhibición contra *Salmonella enteritidis* en todas las concentraciones. Para las frutas adquiridas por la despulpadora Archila como el Maracuyá, los aceites presentaron halos de inhibición de 1,8134 mm ($\pm 0,4360$) a 5000 ppm, 1,7149 mm ($\pm 0,34832$) a 10000 ppm, 1,5278 mm ($\pm 0,81954$) a 50000 ppm y 2,3102 mm ($\pm 0,65803$) en su forma intacta; en la Guanábana, los aceites mostraron halos de inhibición de 1,6206 mm ($\pm 0,2078$) a 5000 ppm, 1,2336 mm ($\pm 0,2161$) a 10000 ppm, 2,6019 mm ($\pm 0,6343$) a 50000 ppm y 6,6887 mm ($\pm 0,0679$) con AE puro, en la Fresa se apreció un halo de inhibición de 4,2001 mm ($\pm 5,939$) con el aceite esencial en su forma intacta. En las frutas obtenidas de manera comercial como el Tomate, los aceites mostraron halos de inhibición de 2,0559 mm ($\pm 0,8841$) a 5000 ppm, 1,0386 mm ($\pm 1,1109$) a 10000 ppm, 2,9719 mm ($\pm 1,2574$) a 50000 ppm y 3,3524 mm ($\pm 1,1082$) en su forma pura; en el Melón se presentó halos de inhibición de 0,5308 mm ($\pm 0,1592$) a 5000 ppm, 0,6661 mm ($\pm 0,0564$) a 10000 ppm, 0,6147 mm ($\pm 0,3039$) a 50000 ppm y 2,002 mm con AE puro.

Finalmente, en la Papaya se exhibieron halos de inhibición únicamente para las concentraciones de 5000 ppm (1,7924 mm ($\pm 0,5603$)), 10000 ppm (1,2383 mm ($\pm 0,4410$)) y 50000 ppm (1,5209 mm ($\pm 0,4723$)), en comparación con ampicilina como el antibiótico comercial empleado en este estudio, como el control positivo.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fitoquímica es una subdisciplina de la química que estudia la materia empleando conceptos físicos y químicos; desde el campo de esta subdisciplina se han realizado un gran número de investigaciones con el propósito de descubrir con gran exactitud, la composición química y los principios de variabilidad de las especies vegetales; la fitoquímica representa una herramienta indispensable en el descubrimiento de los principios activos de las plantas, concediendo a otras disciplinas científicas su utilización en la obtención de nuevos productos y sustancias, Martínez (2020).

De igual forma, a lo largo del tiempo se ha reconocido que las plantas proporcionan fuentes potenciales de diferentes clases de componentes químicos, (terpenoides, alcaloides, fenólicos y glucósidos) que son productos eficaces para el tratamiento y control de diversas enfermedades. Los aceites esenciales y sus compuestos principales, los monoterpenos, se hallan entre las clases más prometedoras de productos naturales que pueden emplearse como agentes más seguros para el control de enfermedades y plagas, Bassolé y Juliani (2012). Los aceites esenciales tienen diversas actividades biológicas y efectos terapéuticos, que pueden usarse en diferentes industrias y tratar varios trastornos en humanos, animales, plantas y alimentos. Los aceites esenciales (AE) son líquidos hidrófobos, oleosos, volátiles y aromáticos que se pueden extraer de las plantas, pueden provenir de células o grupos especializados dentro de regiones particulares de la planta, como tallos, hojas, corteza, madera, follaje, frutos, semillas y rizomas Graca (2010).

La reciente tendencia al uso de compuestos naturales como medicamentos y conservantes de alimentos ha llevado a un aumento en el interés por el uso de aceites esenciales; dichos aceites y sus componentes poseen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes e insecticidas; estas actividades pueden estar mediadas por compuestos individuales o grupos de compuestos; estos metabolitos secundarios tienen funciones biológicas en las plantas de las que se originan, como la protección contra depredadores y patógenos microbianos, así como la intervención en mecanismos de defensa contra el estrés abiótico, Lang y Buchbauer (2011); los aceites

esenciales se constituyen como una sólida base en el ámbito socioeconómico, y se halla en un constante crecimiento a nivel global, sin embargo, Colombia es un país megabiobiodiverso, y esta inmensa ventaja comparativa que representa prácticamente no ha repercutido en su desarrollo económico, considerando que no se han realizado investigaciones que identifiquen oportunidades de proyectos y programas productivos que favorezcan el aprovechamiento sostenible y rentable de nuestra biodiversidad, específicamente en el departamento del Huila el cual cuenta con una amplia gama de diversidad de especies vegetales, el estudio y producción de estas sustancias es escasa debido al poco desarrollo tecnológico de la región que imposibilita la producción de aceites esenciales a gran escala según el Biocomercio Sostenible (2003).

Asimismo, se ha reportado para la familia de la *Siparuna*, actividad antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, tripanocida, presenta efectos inhibidores y repelentes contra plagas de insectos. De acuerdo con Serra (2017), el uso indiscriminado e irracional de algunos antibióticos por el hombre, han provocado un aumento gradual en la resistencia antimicrobiana a nivel mundial, convirtiéndose así en un verdadero problema de salud pública.

De acuerdo con el Ministerio de Salud y Protección Social - MinSalud (2011) la *Salmonella* posee mecanismos que le permiten adherirse a las células epiteliales del intestino delgado y puede sobrevivir al pH ácido del estómago, además, consigue multiplicarse dentro de las células intestinales y liberar una endotoxina que promueve su alta capacidad de infectividad a nivel celular; su mecanismo de invasión tradicionalmente está limitada a las células del intestino, donde puede causar daño en las mucosas del intestino delgado y el colon. En casos de infección con especies de *Salmonella enterica* se ha determinado que puede incluso atravesar el epitelio del tracto intestinal, causando inflamación y liberación de una enterotoxina y una endotoxina, no obstante, en recientes brotes alimentarios se han reportado infecciones urinarias y apendicitis asociadas a *Salmonella*, indicando un nuevo mecanismo de adaptación de este microorganismo a otros tejidos; Barreto *et al.* (2016) reporta que en personas portadoras del síndrome de inmunodeficiencia adquirida pueden llegar a sufrir de

recurrente bacteriemia asociada a *Salmonella*, colonizando otros tejidos del cuerpo como huesos, meninges, hígado y cerebro.

La *Salmonella* es catalogada como uno de los patógenos alimentarios más importantes en todo el mundo y, el MinSalud (2011) se ha reportado que en el mundo anualmente se presentan más de 1,3 billones de casos de salmonelosis y más de tres millones de muertes, la tasa de mortalidad en individuos que se han infectado con *Salmonella* es tres veces mayor que en personas que no se han expuesto a *Salmonella* en el año siguiente a la patología, asimismo, Barreto *et al.* (2016) enuncia que la *Salmonella enterica* es uno de los agentes más relevantes debido a su impacto en la salud pública y la sanidad animal, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La *Salmonella* es el agente etiológico bacteriano más frecuente en los brotes transmitidos por alimentos.

De igual forma Barreto *et al.* (2016) también reporta que en un estudio realizado en Estados Unidos se demostró que en brotes donde la cepa de *Salmonella* era sensible a los antibióticos el porcentaje de hospitalizados era de 8%, mientras que en casos donde las cepas son multi-resistentes el porcentaje aumentaba a 22%; la *Salmonella* puede afectar a cualquier persona, sin embargo, los niños menores de 5 años, las personas inmunocomprometidas y las personas mayores de 50 años presentan mayor riesgo de adquirir Salmonelosis, así como, los grupos socio-económicos que viven en hacinamiento.

El Centro de Control de Enfermedades de E.U.A. (CDC) en su último reporte de amenazas identifica a la *Salmonella* como una amenaza seria, que requiere de mayor investigación, vigilancia y monitoreo, Barreto *et al.* (2016).

La contaminación de los alimentos es en general y crea un riesgo potencial, ya que los errores cometidos en cualquiera de las secciones de la cadena alimentaria como siembra, cosecha, almacenamiento, manipulación, transporte, venta y sobre todo en el momento de la preparación de las comidas, transforman el riesgo potencial en una verdadera multiplicación bacteriana, Parra *et al.* (2002).

En consecuencia, es preciso el descubrimiento de nuevos antimicrobianos de origen natural para reducir las tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades causadas por patógenos, lo cual hace imprescindible un estudio en donde sea comprobada la efectividad de los aceites esenciales de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. contra Salmonela; por lo tanto, se plantea la siguiente pregunta-problema:

¿Cuál es la composición química y el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de la especie vegetal aromática *Siparuna gesnerioides* (Kunth)?

II. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, los aceites esenciales son reconocidos por su alto valor medicinal. Los aceites esenciales se han empleado en la industria como: repelentes, bactericidas, antiparasitarios, fungicidas, antivirales e insecticidas; tienen una increíble, extensa y variada aplicación en múltiples industrias que fabrican productos necesarios para la calidad de vida de los seres humanos. González (2019); Muchos de estos productos contribuyen de forma directa en nuestra salud y bienestar en general; los AE de plantas, han incentivado la atención como agentes bioactivos naturales con actividad antimicrobiana favorable, Mehdizadeh y Moghaddam (2018), ya que son una fuente potencialmente útil de compuestos antimicrobianos que pueden proporcionar una nueva alternativa natural para inhibir bacterias como la *Salmonella*; la cual es un bacilo Gram negativo que hace parte de la familia Enterobacteriaceae, que actualmente contempla cerca de 2600 serotipos o serovares; Este género bacteriano se divide en dos especies: *Salmonella enterica* (6 subespecies) y *Salmonella bongori*, Barreto *et al.* (2016).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (O.M.S), “la *Salmonella* es una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas en el mundo. Cada año, 1 de cada 10 personas contrae enfermedades por esta bacteria; de acuerdo con la OMS, 77 millones de personas todavía se enferman anualmente por consumir alimentos contaminados, de estas personas, alrededor de 9.000 mueren al año y de las personas que se enferman, 31 millones corresponde a una población menor de 5 años de los cuales mueren más de 2.000, O.M.S (2015).

Muchos de los aislamientos que se han realizado en humanos y en animales de sangre caliente se relacionan con la subespecie I: *Salmonella enterica sub enterica*; y el 99% de la enfermedad de salmonelosis se relacionan con este grupo, por otra parte, otras subespecies de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori* se encuentran en el medio ambiente y en animales de sangre fría (especialmente en los reptiles); en general se estima que tienen menor virulencia, pero estudios recientes han señalado nuevos serotipos responsables de nuevos brotes (*S. montevideo*, *S. hadar*). No obstante, otras subespecies como la *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son serotipos

responsables de causar fiebres entéricas (denominadas como fiebre tifoidea y fiebre paratifoidea, respectivamente), estos serovares se han logrado adaptar a los tejidos humanos, y difieren únicamente de otros serotipos por su ecología. Debido a la diversidad de los serotipos identificados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto una clasificación basada en las combinaciones de sus antígenos, MinSalud (2011).

El serotipo es el método empleado para diferenciar las cepas de *Salmonella* más allá del nivel de subespecie; estos serotipos son designados sobre la base de la inmunorreactividad de dos (2) de las estructuras de la superficie celular; básicamente la estructura antigénica de la *Salmonella* es muy similar a la de otras enterobacterias, las cuales presentan dos clases de antígenos principales presentes; los antígenos O (somáticos) y los antígenos H (flagelares). En algunas cepas se presenta un tercer tipo como antígeno de superficie, siendo análogo funcionalmente a los antígenos K de otros géneros; anteriormente se pensó, que esto se relacionaba con la virulencia, así pues, este antígeno se denominó antígeno Vi, Alfaro-Mora (2018).

Antígenos O: Son los antígenos de la pared bacteriana, de naturaleza polisacárida, está compuesto por cuatro (4) o seis (6) azúcares. Existen múltiples antígenos O, y a pesar de ello son los factores O principales, los que sirven para caracterizar los diferentes tipos antigénicos; los epítomos específicos dentro de este se dividen en dos categorías:

1. Antígenos del grupo O: Asociados con la configuración del azúcar que representa el núcleo de la estructura del antígeno O.

2. Antígenos de O auxiliares: Los cuales son hidratos de carbono adicionales que se agregan a la estructura del núcleo O, Parra *et al.* (2002).

Antígenos H: Son antígenos integrados por una proteína, la flagelina, cuya composición en aminoácidos es constante para un tipo antigénico definido; pero depende de dos (2) genes estructurales, que corresponden a la fase 1 y fase 2. La mayoría de las cepas del género *Salmonella* pueden expresar las dos especificidades de su antígeno H

(difásicos), sin embargo, existen algunas que pueden expresar una sola, por ende, expresan ya sea la fase uno o la fase dos (monofásicas), Parra *et al.* (2002).

Antígenos k: El único de este tipo que se conoce en *Salmonella* es en *S. typhi*, *S. paratyphi c* y *S. dublin*, debido a que la presencia de este antígeno hace imposible la aglutinación de sueros anti O; la expresión de este factor va a depender de al menos dos genes (ViA + ViB), en la bacteria deben existir ambos genes para que dicha expresión tenga lugar, Parra *et al.* (2002).

La salmonelosis es una enfermedad causada por una gran cantidad de especies de *Salmonella*, se caracteriza por uno o más de tres signos (septicemias, enteritis aguda que puede llegar a convertirse en enteritis crónica); esta enfermedad es vista en animales y ocurre a nivel mundial. Los animales a su vez realizan un papel importante como reservorios de la infección; la salmonelosis es provocada por la ingestión de carne infectada, leche cruda, huevos, pollo, productos que contienen huevo, repollo y otros alimentos de los que se sospeche que estén infectados. Otra fuente común de transmisión de esta enfermedad son las mascotas reptiles infectadas, por ejemplo, las tortugas; e inclusive otra fuente es el agua para beber que se encuentre contaminada. Por otra parte, uno de los tipos de bacteria *Salmonella* de los miles existentes puede ocasionar fiebre tifoidea, de igual forma, la mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria ocasionan fiebre, calambres abdominales y diarrea, Parra *et al.* (2002).

La *Salmonella* puede estar presente en diferentes fuentes bióticas como por ejemplo en los humanos, se encuentra en las heces de personas infectadas que pueden llegar a contener un gran número de *Salmonella* y puede excretarlo hasta por 3 meses; la bacteria de *Salmonella* posee mecanismos que le permiten adherirse a las células epiteliales del intestino delgado, además puede sobrevivir al pH ácido que posee el estómago, a su vez, esta bacteria responde al estrés oxidativo causado por el óxido nítrico o el peróxido de hidrógeno, posee mecanismos que juegan un papel determinante para la infección a nivel celular, del mismo modo, la habilidad de la bacteria *Salmonella* para inhibir o resistir el pH de los fagosomas es un mecanismo importante de defensa que posee, MinSalud (2011); en animales la *Salmonella* se halla presente en el intestino

de pájaros, reptiles e insectos (ocasionalmente), Brunia (2008), llegando así a infectar a los humanos por medio de su consumo o contacto directo. El cerdo y el pollo son reconocidos como principales reservorios de *Salmonella*, y aunque el hábitat primario de la bacteria de *Salmonella* en pollos es el intestino, de vez en cuando se puede llegar a encontrarse en otras partes del cuerpo como en el pulmón, la tráquea, el saco aéreo o incluso en las articulaciones, Brunia (2008); Muchas de las infecciones de origen animal pasan de manera asintomáticas causando una mayor dificultad para detectarla; dichos animales pueden ser infectados al recibir concentrados contaminados con *Salmonella*.

Muchos de los alimentos como la carne de pollo y otros tipos de carne como pavo o res, provenientes de animales infectados efectúan un importante papel como vehículo de transmisión de la salmonelosis; así mismo existen otros alimentos de origen animal como los huevos, que se relacionan con la transmisión de la bacteria, Patrick *et al.* (2010). Recientemente, se han asociado alimentos como frutas y vegetales (melones, tomates, mangos, lechugas, espinacas y semillas germinadas) como posibles vehículos de transmisión, MinSalud (2011).

La *Salmonella* que proviene de las heces de los animales puede permanecer en aguas y pastos, contaminando de esta manera a otros animales, de igual forma, el insecto puede llegar a ser un vehículo de contaminación al posarse sobre las heces contaminadas y llevándolas a diversos lugares, Parra *et al.* (2002). Este ciclo favorece la propagación de *Salmonella*, llegando así de esta manera a infectar al hombre; según MinSalud (2011) las rutas principales de transmisión de la *Salmonella* en humanos se debe al consumo de alimentos contaminados de los cuales se puede estimar el 90-95% de los casos de salmonelosis se asocia a dicho consumo; otras vías de transmisión bacteriana incluyen: contacto directo con personas infectadas y animales infectados (reptiles utilizados como mascotas) siendo los niños el grupo más vulnerable.

El riesgo de contraer enfermedades de transmisión alimentaria es mayor en países de bajos y medianos ingresos, además de estar vinculada principalmente a la forma de preparación de alimentos con agua contaminada, la falta de higiene y las condiciones inadecuadas en la producción y el almacenamiento de los alimentos, y a su vez por la

escasez de leyes en materia de inocuidad de los alimentos o su falta de aplicación por parte de las autoridades, O.M.S (2015).

En las últimas décadas, el aumento de enfermedades transmitidas por alimentos (E.T.A) asociadas al consumo de alimentos frescos, entre ellos las frutas, ha conducido a las autoridades sanitarias a considerar estas patologías como un problema de salud pública.

Dentro de los principales microorganismos patógenos humanos involucrados en estos brotes están las bacterias *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*; siendo *Salmonella spp.* el agente principal. Las frutas se encuentran expuestas a contaminación por microorganismos patógenos antes, durante y después de su cosecha. En la precosecha la tierra, el agua de riego, la presencia de materia fecal humana o animal, el tipo de abono utilizado, el aire, y las personas que cuidan las tierras de cultivo son elementos importantes para tomar en consideración en cuanto a la contaminación por este tipo de patógenos. En la postcosecha se destacan: la maquinaria y los equipos, los recipientes, animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos que intervienen en la recolección, distribución y comercialización de las frutas y verduras. La naturaleza y la abundancia de la flora contaminante (bacterias, virus, hongos, parásitos) es muy variable entre los diferentes tipos de frutas, Gil *et al.* (2010).

Gran parte de las investigaciones que se han realizado a algunas especies de *Siparuna* han sido realizadas por autores de diferentes países, y están direccionados a mostrar su uso potencial para el control de plagas, Ferreira *et al.* (2017); Toledo *et al.* (2019) y, la caracterización físicoquímica, Franke *et al.* (2014). En cuanto a estudios fitoquímicos se han llevado a cabo algunas investigaciones internacionales enfocadas a la actividad biológica de especies particulares como la especie *Siparuna guianensis*, Andrade, *et al.* (2014); sin embargo, en el ámbito nacional se han realizado estudios de la actividad antioxidante y antibacteriana de *Siparuna sessiliflora*, Pérez *et al.* (2017)¹; Mahecha (2010)².

Por lo tanto, es adecuado buscar distintos métodos que ayuden a los tratamientos en contra de enfermedades producidas por esta especie; dado que en Colombia se tiene una gran diversificación biológica y la presencia de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC, se realizará el estudio o investigación con el fin de comprobar si esta especie vegetal contiene agentes químicos contra la *Salmonella*.

Cabe resaltar, que este es el primer estudio en el ámbito regional, nacional e internacional, sobre los aceites esenciales y el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides*, permitiendo fortalecer no solo los aportes sobre la especie vegetal, sino que de igual fortalecer la línea investigativa sobre aceites esenciales dentro del grupo de investigación en química y desarrollo ambiental (QUIDEA) y, el semillero de investigación de la universidad Surcolombiana (SIQUS).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Caracterizar la composición química de los aceites esenciales de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas y evaluar su potencial como agente antimicrobiano contra *Salmonella enteritidis*.

3.2. Objetivos Específicos

- Establecer el rendimiento de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. obtenidos mediante hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor de agua y destilación asistida por radiación microondas.
- Analizar la composición química de los aceites esenciales mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar el potencial antimicrobiano contra *Salmonella enteritidis* de los Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. mediante la prueba de difusión en agar.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. Generalidades de la Familia *Siparunaceae*



Ilustración N° 1 *Siparuna sessiliflora* (Kunth) A. DC. Tomada de: David et. al (2014) pág. 215

La familia *Siparunaceae* está constituida por arbustos, sub-arbustos y árboles, los cuales pueden ser dioicos o monoicos, pueden llegar a alcanzar hasta los 40 metros de altura. Rener (2009) incluye a los géneros *Siparuna* la cual cuenta con un aproximado de 63 especies distribuidas en América tropical como se cita en Carrillo *et al.* (2015), y el género *Glossocalyx* conformado por sólo una especie la cual se encuentra distribuida en África occidental. En el pasado estos dos géneros estaban incluidos dentro de la familia *Monimiaceae* en la tribu *Siparunaceae* como se cita en Vigosa (2015) cuya principal característica está dada por la presencia de anteras con dehiscencia valvar y óvulos con placentación basal. En 1970, Schodde propuso a las *Siparunaceae* como una

familia independiente de *Monimiaceae*, ya que las características anatómicas y genéticas tanto de la madera, hojas, flores, polen, morfología del fruto, embriología, número de cromosomas, así como la distribución geográfica y ecológica respaldaban esta separación Fonseca y Vigosa (2015).

Desde el punto de vista etnobotánico, esta familia representa un alto nivel de importancia en el aspecto medicinal y económico, algunas comunidades centroamericanas y sudamericanas implementan tanto hojas como frutos de algunas especies en la medicina tradicional para el tratamiento de resaca, tos, fiebre, enfermedades gastrointestinales y reumatismo, del mismo modo, algunas especies son maderables y comercializadas, Fonseca y Vigosa (2015).

4.2. Género *Siparuna*



Ilustración N° 2 *Siparuna thecaphora* (Poepp. & Endl.) A. DC. Tomada de: David et. al (2014) pág. 215

Dentro del orden Laurales se encuentra el género *Siparuna* representado por aproximadamente 150 especies, ubicados geográficamente desde Centroamérica hasta

Suramérica, representado principalmente por árboles, arbustos, subarbustos y/o en algunos casos lianas que producen aceites esenciales con un olor característico a cítrico, con hojas perennes, clasificadas generalmente como plantas aromáticas, entre sus metabolitos secundarios se encuentran alcaloides y flavonoides, y una amplia variedad de actividades biológicas, Leitão (1999).

4.3. *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A. DC.



Ilustración N° 3 Estructuras aéreas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A. DC. (Hojas, Frutos, Inflorescencia)

Es un arbusto dioico cuya altura varía entre los 2 a 10 m de alto, densamente pubescente con tricomas fasciculados, de hojas opuestas, ovaladas de 10 a 28 cm de largo, y 4 a 10 cm de ancho, ápice acuminado, margen denticulado, en cada dentículo una glándula secretora de agua (hidátodo), base atenuada, papiráceas, con ambas caras medianamente pubescentes, con tricomas fasciculados. Flores amarillas o anaranjadas; flores densamente pubescentes, con tricomas fasciculados; perigonio de 4 a 7 tépalos de hasta 1.4 mm de largo, frecuentemente fusionados en la base; frutos drupáceos grises o amarillentos, cada uno con un arilo estilar rojo, dentro del receptáculo de color verde

con manchas claras en estado inmaduro y de color rojo en la maduración, de 1 a 1.5 cm de diámetro en seco, subgloboso, coronado o no por los tépalos persistentes, con intenso aroma a limón, Fonseca y Vigosa (2015).

4.4. Generalidades de la Familia *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias son microorganismos Gram negativos ubicados taxonómicamente dentro de las proteobacterias gama y se encuentran estrechamente relacionados con enfermedades transmitidas por los alimentos provocando episodios diarreicos, son coco-bacilos o bacilos, no producen esporas, pueden ser móviles o inmóviles y presentar o no capsulas, metabólicamente pueden ser aerobios o anaerobios facultativos, capaces de fermentar la glucosa con producción de ácidos y/o gas, se desarrollan en el suelo, agua y vegetales, hacen parte de la microbiota del intestino de animales como de humanos.

La familia *Enterobacteriaceae*, se divide en grupos según sus características bioquímicas con un total de 44 géneros y 175 especies, de estas, una veintena son patógenas, dentro de los géneros y especies de mayor importancia involucradas en los procesos patológicos y estrechamente relacionados a contaminación alimenticia son *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y otras *Salmonellas*, *Shi-gellas spp*, *Achromobactaer sakazaki*, *Yersinia enterocolítica*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y otras Linzitto y del Luján (2009).

4.5. Género *Salmonella*

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentra el género *Salmonella*, conformada por bacilos Gram negativos, de tipo anaerobios facultativos, flagelados peritricos que le conceden movilidad, son de tipo no esporulados, utilizan el citrato como única fuente de carbono, el tipo de metabolismo que poseen es oxidativo y fermentativo; su crecimiento no requiere de cloruro de sodio y pueden llegar a crecer en concentraciones que van desde 0.4% al 4%. Los serotipos de *Salmonella* en su mayoría crecen en un rango de temperatura de 5°C a 47°C, teniendo como temperatura optima de

35°C – 37°C, algunas de las especies pueden llegar a desarrollarse a temperaturas de 2°C, 4°C y hasta 54°C; La oscilación del pH de crecimiento de la *Salmonella* se encuentra entre 4 a 9 con un óptimo entre 6.5 a 7.5. El género *Salmonella* se desarrolla bien a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, llegando a sobrevivir en alimentos secos. La inhibición de crecimiento de este género se desarrolla a temperaturas inferiores a los 7°C. Dentro de sus características encontramos su amplia distribución, su alto nivel de patogenicidad y su difícil aislamiento, dentro del sistema de Kauffmann-White se han identificado 2500 serotipos, siendo la *Salmonella entérica*, *Serovar typhimurium*, *Enteritidis* y *Newport* los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial Gonzalez *et al.* (2014).

Al género *Salmonella* se le imposibilita la fermentación de lactosa y sacarosa, pero por el contrario se caracteriza por fermentar glucosa y manosa sin producir gas, Brooks *et al.* (2011).

4.6. Antecedentes

En el siguiente apartado se encuentra descrito los estudios de mayor impacto e interés relacionados con la familia *Siparunaceae* encontrados en la literatura científica, además de algunos estudios relacionados con la obtención de Aceites Esenciales y su amplia gama de aplicación biológica como agentes antimicrobianos, tomando como referencia estudios que datan de 1994 hasta el 2019. Cabe destacar que esta familia ha sido poco estudiada.

4.6.1.1. 4.6.1. Internacionales.

Jenett-Siems *et al.* (2003) realizaron la investigación fitoquímica de las hojas de *Siparuna pauciflora*, así como su evaluación contra dos cepas de *Plasmodium falciparum*; El análisis de una fracción cruda de alcaloides de las hojas de *S. pauciflora* arrojó como resultado la presencia de las aporfina: *n*-boldina, boldina, laurotetanina y N-metil-laurotetanina, que fueron identificados por comparación espectral; en este estudio se demostró la aparición de la N-metil-lauro-tetanina que no había sido previamente

reportada en la especie. Estudios realizados a los extractos de las hojas y tallos de la planta medicinal ecuatoriana *Siparuna macrotepala* evidenció la presencia de sesquiterpenos del grupo cadinano: cadaleno, calamaneno, 7-hidroxi-calamaneno, el dímero de 7-hidroxi-calamenene de configuración S,S y dos nuevos compuestos: 1-hidroxi-calamaneno y 1,6-dimetiltetrahidronaftalenona-4 en donde se empleó el método de TLC sobre vidrio de sílica gel. El-seedi *et al.* (1994) realizaron estudios de alcaloides para tres especies de *Siparuna*: *S. dresslerana*, *S. nicaraguensis* y *S. patelliformis*. Para *S. dresslerana* se detectó el alcaloide morfina y la dienona 0-metilflavinantina y la flavinantina. Se descubrió que los tallos de *S. nicaraguensis* contenían liriodenina, y que las hojas de *S. patelliformis* contenían pequeñas cantidades de alcaloides Gerard *et al.* (1986).

Otros estudios como el de Franke *et al.* (2014) analizaron la composición fisicoquímica de los aceites esenciales de *Siparuna guianensis aublet* y la micrografía de la hoja de *S. guianensis* mostrando la presencia de epidermis uniseriada cubierta por una fina capa de cutícula con tricomas glandulares pegadas en ambos lados, uniseriado, multicelular, no radiográfico predominante en la epidermis abaxial, y sus conductos secretores, formados por cavidades alargadas resultante de la unión de varias células secretoras epiteliales, recubierto a su vez con células adyacentes; su importancia está en la posibilidad de producción de aceites esenciales y síntesis de monoterpenos, terpenos, encías y taninos, especialmente durante la floración de algunas especies de plantas. Se hallaron sesquiterpenos oxigenados con 75.07% (en masa) y de estos el β -mirceno, con 67.30%, seguido de monoterpenos oxigenados 8,37% en peso, representado básicamente por 2-undecadona. El resto, como porcentaje en masa (15.83%), no fue identificado con respecto a su constitución química. La caracterización física de la investigación fue realizada a partir del análisis TG / DSC el cual permitió verificar el rendimiento térmico de oxidación parcial con un evento exotérmico que alcanza un máximo de 148.3 °C.

En estudios realizados por Toledo *et al.* (2019) y Ferreira *et al.* (2017) se analizó la composición cuantitativa y cualitativa de *S. guianensis*, el cual indicó que el monoterpeno β -mirceno (45,6%) y la cetona acíclica no terpénica 2-undecanona (17,9%)

fueron las constituyentes principales de su aceite esencial. Se evidenció además su uso potencial como insecticida contra plagas como el pulgón verde del melocotón *Myzus persicae* (Sulzer), y también sobre dos enemigos naturales: el *Ladybeetle predators*, *Coleomegilla maculata* (DeGeer) y *Connexa eriopis* (Germar) y las polillas de cera; presentando estimaciones de la media de supervivencia/ tiempo (LT 50), resultando que los pulgones expuestos a 1,08 mg de aceite esencial de Negramina /cm² exhibieron un LT 50 de 4h que no difirió del LT 50 de 5h registrado para deltametrina. En los bioensayos de repelencia, el número de pulgones se redujo en una manera dependiente de la concentración con las hojas tratadas con el aceite esencial de Negramina en una concentración tan baja como 0.14 mg / cm²; las hojas tratadas con LC₁₀ y LC₅₀ del aceite esencial de Negramina tenía solo 5.0 y 2.5% de pulgones, respectivamente. La exposición de larvas o insectos adultos de ambos escarabajos depredadores (*C. maculata* y *E. connexa*) al aceite esencial de Negramina a 1.08 mg /cm² (que corresponde a la LC 95 contra *M. persicae*) no dio un resultado significativo de mortalidad a más del 5% de cualquier fase de desarrollo de ambos depredadores, por otra parte en el estudio realizado con polillas se evidenció la eficacia del aceite esencial, sobre esta plaga ya que ninguna larva de la polilla de cera permaneció viva con 24 h de exposición al aceite de *S. guianensis*.

Se encontraron estudios de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Siparuna schimppffii diels* (Limoncillo) en donde se realizó la extracción del aceite por medio de un destilador de acero inoxidable el cual funcionó con el mecanismo de destilación de agua y vapor de agua; además se empleó el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas encontrándose que el aceite esencial está compuesto mayoritariamente por hidrocarburos (91,689 %), y compuestos oxigenados (8,311 %) dentro de las cuales, un 97,218 % correspondieron a sesquiterpenos y un 2,782 % a monoterpenos. Los componentes más representativos del aceite esencial de las hojas de *Siparuna schimppffii diels* son: germacreno D (35,338 %), biciclogermacreno D (8,730 %), g-muruleno (7,035 %), germacreno B (6,359 %) y el *trans*-4-cadinadieno (5,161 %) Noriega *et al.* (2014).

La composición química del aceite de las hojas de *S. schimppffii* tiene cierta similitud con la de los aceites de *Siparuna thecaphora* y *Siparuna pauciflora*, sobre todo por la presencia de sesquiterpenos como el germacreno A y germacreno D, como componentes más abundantes Noriega *et al.* (2014).

Por último, se encontró un estudio realizado por Andrade *et al.* (2014) quienes analizaron la actividad antibacteriana, antifúngica y tripanocida de los aceites esenciales de *Mollinedia lanceolata* (*Monimiaceae*), *Siparuna sessiliflora* (*Siparunaceae*) y *Croton leptostachyus* (*Euphorbiaceae*). Se emplearon métodos como la hidrodestilación empleando un aparato Clevenger modificado, cromatografía gas-líquido acoplada a espectrometría de masas. La evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se llevó a cabo empleando las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis* y *Pseudomonas aeruginosa*. La evaluación de la actividad antifúngica se realizó con *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* y *Penicillium commune* y finalmente se analizó la actividad de los aceites esenciales contra los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*; Ambos aceites esenciales mostraron un efecto inhibitor débil con valores altos de MIC (rango: 125,00 a 500,00 µg/mL) para bacterias Grampositivas, y no presentaron efecto inhibitor sobre bacterias Gramnegativas. Las bacterias Grampositivas *L. monocytogenes* y *S. aureus* fueron más susceptibles al aceite esencial de *S. guianensis*. Por otra parte, ambos aceites esenciales fueron activos contra todos los hongos evaluados, con concentraciones inhibitorias que variaron de 7.81 a 250 µg mL⁻¹. El aceite esencial de *S. guianensis* fue más efectivo, con valores de MIC más bajos. La especie *A. flavus* mostró una mayor sensibilidad para el aceite esencial de *S. guianensis* y *P. comune* que para el aceite esencial de *C. dinisii*, mientras que *A. carbonarius* fue la especie fúngica más resistente, en comparación con los dos aceites esenciales evaluados. Todos los microorganismos fueron sensibles a 20 µg mL⁻¹ de hipoclorito de sodio.

Por último, ambos aceites esenciales mostraron un débil efecto inhibitor sobre el protozoo *T. cruzi*, evidenciándose un aumento de la inviabilidad de los epimastigotos

con concentraciones crecientes de ambos aceites esenciales después de 24 h de tratamiento. Se obtuvo mejor actividad para *S. guianensis* Andrade *et al.* (2014).

4.6.1.2. 4.6.2. Perspectiva de investigaciones con indicaciones clínicas

En una revisión de estudios de actividades biológicas en especies del género *Siparuna* realizado por Mahecha (2010) se distinguen algunas de las indicaciones en el sector salud; en un estudio realizado a la *Siparuna thecaphora* se evaluó el efecto de sus extractos etanólicos de las ramas y hojas contra el veneno de serpiente, donde se obtuvo como resultado $50\% \pm 13\%$ de neutralización del veneno, por otra parte, se realizó una evaluación a la acción antibacteriana de las especies *Siparuna conica* y *Siparuna guianensis* en donde se reportó una acción positiva sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; en otra de las investigaciones realizadas sobre *Siparunas* se examinó la *Siparuna guianensis*, la cual es conocida popularmente como una planta con usos calmantes e hipnóticos; evaluando asimismo esta actividad en el extracto de las hojas de la *S. guianensis* resultando positivo contra la ansiedad, de igual manera se ha reportado, que la planta contiene actividad sobre el sistema nervioso central (SNC); en esta misma especie se evaluó el extracto metanólico en concentración de 15,74 g por cada 100 gramos de planta seca, evidenciándose actividad antimicrobiana contra *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Por último, en un estudio realizado a las plantas *Siparuna aspera* y *Siparuna radiata* se evaluaron sus extractos metanólicos de las hojas frente a la malaria, presentando actividad positiva con un IC_{50} de $6.4 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$ y un IC_{50} de $21.7 \pm 7.2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente; de igual forma, el extracto metanólico de las hojas de *Siparuna radiata* presentó actividad frente a la *Leishmania* con un $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

Para aceites esenciales de *Siparuna Sessiliflora*, Mahecha (2010) reportó actividad antitumoral en concentraciones que van desde los 10 a los 100 μM , y a esta misma concentración, se determinó actividad antiangiogénica, recomendándose en el desarrollo de medicamentos que tratan las angiogénesis producidas durante el desarrollo de las células cancerosas.

Por último, en un estudio realizado por Pérez *et al.* (2017) se evaluó la actividad antioxidante de los extractos etanólicos de *S. sessiliflora* con un modelo de células sanguíneas (eritrocitos) donde se logró evidenciar alta toxicidad frente a estas células evaluadas, a través de la hemólisis. En estos extractos de *S. sessiliflora* se detectó la presencia de saponinas, las cuales podrían ser los responsables de la toxicidad limitando su uso en aplicaciones fitoterapéuticas.

4.6.1.3. 4.6.3. Nacionales y Regionales.

En la región andina se han encontrado aportes significativos en cuanto a investigaciones de aceites esenciales, tal es el estudio realizado en Medellín- Antioquia por Martínez M. *et al.* (2003) donde se mencionaron distintos métodos de extracción y aislamiento de los aceites de aproximadamente 60 familias de plantas; entre ellos destilación por arrastre con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, extracción con fluidos supercríticos y el método de enflorado o enfleurage; asimismo se expone la definición y clasificación de los monoterpenos y sesquiterpenos. De igual forma, se presentan los diferentes métodos de análisis que se pueden emplear como extracción y aislamiento por cromatografía: Cromatografía en columna (CC), en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia (HTPLC), y la cromatografía de gases (CG), por caracterización espectral (infrarrojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear, entre otras); aunque en el estudio no se empleó como muestra la familia Siparuna, el estudio permite obtener referentes teóricos con respecto a los distintos métodos que se pueden llegar a implementar en este tipo de investigaciones. Stashenko *et al.* (2014) llevaron a cabo el estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (*Verbenaceae*) cultivadas en Colombia; realizando aportes en cuanto al uso del método por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas empleada para la extracción e identificación de los compuestos fisicoquímicos del aceite esencial y la implementación de métodos como ORAC y TEAC para la evaluación de la capacidad antioxidante del mismo. En cuanto a

estudios realizados a los aceites esenciales de la familia Siparuna en el ámbito regional no se encontraron investigaciones que brinden soporte teórico a esta investigación.

4.6.1.4. 4.6.4. Institucionales.

En la Universidad Surcolombiana se encontró un aporte significativo en cuanto a la investigación realizada por Ríos y Rojas (2017) sobre el estudio comparativo del rendimiento y la composición química de los aceites esenciales de *Pasiflora maliformis* y *Pasiflora ligularis juss*, en el que reportaron carvacrol, un metabolito no reportado antes para esta familia. El mejor rendimiento fue aportado por la técnica de hidrodestilación. Así mismo, se encuentra un estudio sobre los aceites esenciales de la especie vegetal de la Curuba india (*Passiflora tarminiana*), siendo el método de destilación asistido por microondas el que permitió el mayor rendimiento de las muestras. Los compuestos de cada uno de los aceites esenciales se identificaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, encontrándose 46 compuestos volátiles en el AE de los tallos, 17 en el AE de las flores y 35 en el AE de las hojas, donde los compuestos más abundantes fueron hidrocarburos, Rodríguez y Cuy (2021).

4.6.1.5. 4.6.5. Algunos estudios con aceites de Siparuna.

Se puede aludir a un estudio nacional realizado por la Universidad Javeriana en Bogotá - Colombia desarrollado por Mahecha (2010); que corresponde a la investigación de la actividad antioxidante y antibacteriana de los aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflora*; esta investigación se abordó desde dos aspectos, uno químico en el que se pretendió extraer e identificar los aceites esenciales y otro biológico en el que se determinó la actividad antioxidante y antibacteriana, se emplearon 3 tipos de métodos para la extracción de los aceites esenciales: Hidrodestilación (HD), Destilación por extracción con solvente simultanea (DES) y Micro extracción en fase solida (SPME); La identificación de las sustancias presentes en los aceites esenciales se

realizó: en hojas comparando con índices de Kovats y espectros de masas provenientes de las librerías NIST 2,0 y WILEY 7n; y en fruto por comparación de los espectros de masas obtenidos de los componentes con espectros de referencia de las librerías mencionadas anteriormente. La identificación de las sustancias que hacen parte del aceite esencial del fruto de *Siparuna sessiliflora*, se realizó a través de análisis CG-MS, inicialmente se separan los compuestos empleando una columna capilar, posteriormente se procesaron los datos de espectrometría de masas, utilizando la base de datos *MSD Chemstation G1701DAD.03.00611*, realizándose posteriormente una comparación con las librerías NIST 2,0 y WILEY 7n.

Mahecha (2010) realizó la actividad antioxidante (método ABTS) y, para la actividad antibacteriana (técnica de difusión en agar) empleando concentraciones de 20 mg/mL, 10 mg/mL y 5 mg/mL para *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; mientras que para las bacterias Gram negativas se escogieron: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Para los constituyentes del aroma del fruto de *S. sessiliflora* extraídos por la técnica SPME, se lograron identificar 18 compuestos (90,7%); 2 monoterpenos (M), 10 sesquiterpenos (S) y 6 hidrocarburos alifáticos (HA); por otra parte, para los aceites esenciales que fueron obtenidos de las hojas de *Siparuna sessiliflora*, se empleó la técnica de hidrodestilación (HD) en donde se detectaron 62 compuestos por GC-MS, de los cuales se identificaron 42 (77,4%) de ellos como hidrocarburos alifáticos (5), 5 monoterpenos, 1 compuesto aromático y 31 sesquiterpenos entre los que resaltan como componentes principales el β -eudesmol (27,2%), τ -muurolol (13,8%), β -Selineno (1,8%), Germanceno- D (5,7%) y τ -Cadinol (3,7%). Mahecha (2010). De igual forma, en el aceite esencial aislado por la técnica DES se detectaron alrededor de 67 compuestos, y se lograron identificar 40 (81 %) de ellos, dentro de los cuales se encontraron 3 hidrocarburos alifáticos, 5 monoterpenos, 1 compuesto aromático y 30 sesquiterpenos; los componentes principales fueron el β -eudesmol (26,6%), τ -muurolol (13,3%), Germanceno- D (7,0%), δ -elemeno (4,3%) y τ -Cadinol (3,7%). El β -eudesmol, fue el componente mayoritario del aceite esencial obtenido de las hojas en ambos

métodos (27%). El porcentaje de rendimiento que se reportó para los aceites esenciales de la planta expresado en porcentaje (gramos de aceite obtenido por cada 100 g de muestra) se encuentra entre el 0,12% y el 0,17% para hojas y 0,11% y 0,14% para frutos, esto dependiendo de la técnica empleada. El porcentaje de rendimiento para hojas se calculó en base seca y el rendimiento para fruto se calculó en base húmeda; se reportó actividad antitumoral en concentraciones que van de los 10-100 μM , y a esta misma concentración se determinó que también posee actividad antiangiogénica y se recomendó para el desarrollo de medicamentos que tratan la angiogénesis producida en el desarrollo de las células cancerosas Mahecha (2010).

Por otra parte, para la actividad antioxidante se preparó una curva de calibración en donde se prepararon soluciones de trolox a concentraciones de 0,1 mMol a 0,6 mMol con una efectividad del 22,0% y un 92,3%. El rango efectivo del trolox en ppm va de 25 ppm a 150 ppm. Asimismo, para la actividad antibacteriana: se observaron halos de inhibición por parte de los aceites esenciales frente a bacterias grampositivas; no presentó actividad antibacteriana frente a las bacterias gramnegativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*); en ese sentido, se tiene que para las actividades positivas, se procedió a realizar la medición de los halos de inhibición con el fin de verificar el tipo de sensibilidad que presenta las bacteria frente al aceite; dicha actividad antibacteriana frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* dio como resultado que el aceite de hojas extraído por DES obtuvo halos de inhibición entre 21 mm y 33 mm, y se evidenció mayor actividad que en el aceite por HD en las mismas concentraciones, mientras que para el fruto obtenido por DES, los halos de inhibición se hallaron entre 19 mm y 29 mm, muy parecidos a los encontrados en hojas por HD, Mahecha (2010), de igual forma para la actividad antibacteriana frente a la bacteria *Bacillus subtilis* los aceites esenciales de hojas obtenido por HD y DES, presentaron una ligera mayor actividad en los aceites extraídos por DES. Sin embargo, los aceites de los frutos presentaron mayor actividad, tanto en los aceites esenciales por DES como para HD Mahecha (2010).

4.6.1.6. 4.6.6. Revisión general de compuestos en varias especies de *Siparunaceae*.

En una amplia y completa revisión de todos los estudios mencionados con anterioridad se conocen los siguientes metabolitos presentes en esta familia: alcaloides, polifenoles, taninos, flavonoides y fenilpropanoides, asimismo los aceites esenciales de *Siparuna* presentan en su composición principal monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos alifáticos; en la revisión bibliografía realizada se presenta una mayor intensidad de estudios con las especies de *Siparuna sessiflora*, *Siparuna guianensis* y estudios ocasionales con las demás especies, por último, no se reporta estudios e investigaciones con la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth).

4.7. Referentes Conceptuales

A continuación, se abarcan algunas referentes relacionados a los Aceites esenciales y sus características, métodos de obtención, su composición y algunos ejemplos.

4.7.1.1. 4.7.1. Aceites Esenciales

Los Aceites Esenciales (AE) son una mezcla de sustancias aromáticas producidas por muchas plantas, son compuestos naturales, líquidos volátiles, de composición compleja con agradable aroma, que provienen de plantas a las que aportan olores particulares, generalmente gratos, y que son extraídos mediante múltiples técnicas, de las cuales, la más común es la destilación.

También, se definen como mezclas de componentes volátiles, productos del metabolismo secundario de las plantas, compuestos en su mayor parte por hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos que corresponden a la fórmula $(C_6H_8)_n$, junto con otros compuestos casi siempre oxigenados que transmiten a los Aceites Esenciales el aroma que los caracteriza, Montoya (2010).

Los AE generalmente se encuentran conformados por complejas mezclas de más de 100 diversos compuestos, dentro de los cuales en su gran mayoría pueden ser clasificados dentro de las series Terpénicas (volátiles con peso molecular bajo: monoterpenoides (C₁₀), sesquiterpenoides C₂₀) y Arénicas (compuestos aromáticos principalmente derivados del fenilpropano, producto del metabolismo del ácido Shikimico como por ejemplo las cumarinas o fenilpropanoides de peso un poco más elevado).

Reciben el nombre de Aceites dada su naturaleza física y su consistencia similar a la de los ácidos grasos, diferenciándose de estos últimos, ya que, al dejar caer una gota de este sobre un trozo de papel se produce la volatilización de la gota sin dejar rastro sobre la superficie del papel, Montoya (2010).

Dentro de sus cualidades físicas se puede distinguir su olor pronunciado y penetrante, un sabor caustico concentrado e irritante, con una densidad inferior con relación al del agua con algunas excepciones (canela, clavo, sazafrán, con una densidad mayor), ópticamente activos, con un punto de ebullición aproximada desde los 150°C hasta los 300°C, con un índice de refracción de 1,45 a 1,5 indicando así la posible alteración ante la luz, son altamente volátiles, solubles en los aceites, alcohol, éter de petróleo, tetracloruro de carbono y demás solventes orgánicos; e insolubles en agua, aunque transmiten algunas de sus propiedades (olor), su aspecto es oleoso aunque presentan fluidez como la del agua, presentan inflamabilidad, y son obtenidos principalmente por medio de técnicas de arrastre de vapor de agua, Montoya (2010).

4.8. Métodos de Análisis Instrumental

Los métodos de análisis instrumental son métodos modernos de separación, cuantificación e identificación de componentes químicos presentes en mezclas; muchos de estos métodos instrumentales se basan en fenómenos fisicoquímicos que aplican fundamentos de óptica y radiación electromagnética en sus procesos de funcionamiento, se basan en propiedades físicas que pueden utilizarse como señales analíticas en el

análisis cualitativo o cuantitativo de la muestra, empleando señales específicas para la determinación del método instrumental tales como la emisión de la radiación la cual se emplea en métodos como la espectroscopia de emisión en técnicas como rayos X (Visible de electrones Auger), la fluorescencia y fosforescencia; la dispersión de la radiación para métodos como la turbidimetría, la relación masa/carga para la técnica de espectrometría de masas; interacción con las radiaciones de energía, donde se derivan técnicas de análisis de espectroscopía de absorción molecular, fluorescencia molecular, espectroscopía atómica y de masas, métodos de separaciones analíticas como la cromatografía de gases y de alta resolución; entre otras.

La presente investigación utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, por lo tanto, en el siguiente apartado se mencionan algunos aspectos más importantes, que permiten comprender el funcionamiento de esta técnica.

4.8.1.1. 4.8.1. Cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS)

Dentro del campo del análisis químico, la cromatografía de gases acoplado a la espectrometría de masas, se constituye como una herramienta de gran potencia con la capacidad de separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas, como lo son los aceites esenciales; por un lado la cromatografía de gases (GC) es una técnica meramente separativa, así, una vez separados, detectados, e incluso cuantificados los componentes individuales presentes en la muestra problema, se logra obtener un cromatograma donde se encuentran plasmados cada uno de los picos correspondientes a los tiempos de retención de cada componente, siendo este dato insuficiente para la correcta identificación de los diversos compuestos, por otra parte, la espectrometría de masas (MS) identifica de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero no posee la capacidad de identificar los componentes individuales de una mezcla. De este modo, la asociación de las dos técnicas, GC y MS permite la separación e identificación de mezclas complejas.

De forma más concisa, la CG-MS actúa de la siguiente manera, se inyecta una mezcla de compuestos en el cromatógrafo donde se produce la separación dentro de la

columna cromatográfica, obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados presentes en la muestra problema, luego pasan inmediatamente al detector (espectrómetro de masas), cada componente se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas, Gutiérrez y Droguet (2002).

Los índices de retención de Kovats (I), se determina mediante la asignación de 100 veces el número de átomos de carbono de n -hidrocarburos lineales presentes en una muestra. De esta forma, al ser sometida la muestra con n -hidrocarburos semejantes al cromatógrafo, las fuerzas intermoleculares que presentan son relativamente constantes y la separación está controlada esencialmente por las diferencias en la presión de vapor, Sandoval (2008).

El índice de retención de Kovats presenta un valor único para cada compuesto o molécula; así de esta forma, se puede llevar a cabo la identificación de compuestos mediante la comparación con los datos ya estandarizados en las diferentes bases de datos. La determinación de este valor está dada por el producto de una relación logarítmica entre los tiempos de retención que posee el analito en estudio (muestra) y los tiempos de retención establecidos de los n -alcanos anterior y posterior al analito, tal como se muestra en la siguiente ecuación (Guerrero Sandoval, 2008):

$$I = 100N + 100n \left(\frac{t_{Rx} - t_{Rz}}{t_{R(z-1)} - t_{Rz}} \right)$$

Donde:

t_{Rx} : Tiempo de retención del analito X

N : Numero de carbonos del alcano con tiempo de retención (t_{Rz}) inmediatamente anterior al analito.

n : Diferencia entre N° de C de los n -alcanos entre los que se encuentra el componente

$t_{R(z+1)}$: Tiempo de retención del n -alcano localizado inmediatamente después del analito.

4.9. Métodos de Extracción de Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son sustancias químicas compuestas por fracciones volátiles de los metabolitos secundarios de las plantas, dadas sus propiedades químicas y físicas es necesario obtenerlos por medio de diversas técnicas de destilación e hidrodestilación, de las cuales se tratarán principalmente tres de estas, las cuales están formuladas para uso a nivel de laboratorio y su clasificación está dada a escala Cerpa (2007).

4.9.1.1. 4.9.1. Destilación por arrastre con vapor de agua (SD)

Dentro de los métodos de extracción de aceites esenciales, la destilación por arrastre con vapor de agua es el método más usado, dado que es un método relativamente sencillo y genera un producto de gran calidad, mediante la aplicación de una corriente de vapor proveniente de una caldera externa sobre el lecho del material vegetal, el cual provoca que los aceites esenciales migren desde la membrana de la célula hasta el exterior, este vapor se acumula en un condensador que se encarga de enfriar el vapor y regresarlo a la fase líquida la cual se introduce en un decantador para separar las dos fases inmiscibles Ruiz (2019).

4.9.1.2. 4.9.2. Hidrodestilación (HD)

Durante este proceso el material vegetal es sumergido directamente en un recipiente con agua, al cual se le aplica el calor suficiente hasta conseguir la ebullición del agua, mediante este proceso, el vapor que se genera desprende las moléculas de AE presentes en el material vegetal y son llevadas a un condensador; el material condensado es depositado en un decantador donde se separa el AE de la fase acuosa, este proceso se da mediante el principio de separación que se basa en la destilación azeotrópica dado que se forma una mezcla heterogénea del agua y el aceite luego de la extracción a presión atmosférica, alcanzando una temperatura de ebullición cerca a los 100°C, impidiendo que los componentes de los AE se pierdan durante el proceso, además, la

mayoría de las moléculas terpénicas de los AE son inmiscibles con el agua lo que facilita el proceso de decantación simple González (2019).

4.9.1.3. 4.9.3. Hidrodestilación asistida por la radiación con microondas (MWHD)

La MWHD consiste en someter a radiación de microondas el material vegetal sumergido en agua durante un periodo de 10 a 30 minutos aproximadamente, cuando el agua alcanza su punto de ebullición por acción del vapor libera los compuestos del AE contenidos en las glándulas por efecto de la presión del vapor; al ser los compuestos volátiles son arrastrados hasta el condensador donde el vapor es enfriado, el líquido resultante forma dos capas, una de ellas rica en aceite y la otra en la cual predomina el agua (hidrolato), y su separación se lleva mediante el proceso de decantación, Torrenegra (2014).

4.10. Evaluación Biológica

Sánchez *et al.* (2016) “Las pruebas de susceptibilidad microbiana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de éstas”. Varios de los factores pueden influir de manera directa e indirecta en la obtención de los resultados en forma contundente, como lo pueden ser el tipo de extracción, el tipo de bioensayo, la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de la actividad antimicrobiana. Dentro de los métodos para la evaluación antibacteriana como antifúngicos los principales grupos son la difusión, dilución y métodos bioautográficos según Ramírez y Marín (2009), citado en Sánchez *et al.* (2016).

4.10.1.1. 4.11.1. Método de difusión

Se caracteriza por ser un método de cultivo de fácil estandarización siendo el indicado para trabajar con microorganismos de crecimiento rápido y no exigentes, puede realizarse en pozo o en disco, se encuentra estandarizado y recomendado por el comité de ensayos de susceptibilidad NCCLS; mediante este método se determina en forma cualitativa el efecto de ciertas sustancias (naturales o farmacéuticas) sobre cepas bacterianas provenientes de muestras aisladas de pacientes o de referencia (ATCC) Sánchez *et al.* (2016).

Sánchez *et al.* (2016), describe la forma en el cual se desarrolla este método de la siguiente forma:

“Esta técnica se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar y sobre el cual se coloca un papel filtro de 6 mm de diámetro o se deposita en un pozo en el agar de la placa una cantidad determinada de la sustancia a probar”.



Ilustración N° 4 Antibiograma mediante técnica Kirby-bauer en el que se observa la presencia de halos de inhibición. Tomada de: Cercenado & Saavedra (2009)

4.10.1.2. 4.11.2. Escala de McFarland

Los estándares de McFarland son patrones de turbidez que se preparan con una mezcla de diversos volúmenes de ácido sulfúrico al 1% y cloruro de bario al 1,175% obteniéndose soluciones con densidades ópticas específicas; La escala de McFarland consta de 11 patrones que van desde 0,5 a 10 y cada uno de ellos tiene una turbidez comparable a la de una suspensión bacteriana con una densidad determinada.

Según Forbes (2009) “El uso de un tamaño estándar del inóculo es tan importante como la pureza del cultivo y para lograrlo se compara la turbidez de la suspensión del microorganismo con el estándar de turbidez de McFarland; la comparación a simple vista de la turbidez se determina colocando la suspensión bacteriana y el tubo de McFarland uno al lado del otro y se observan contra un fondo con rayas negras, permitiendo que la densidad de las suspensiones bacterianas pueda ser semicuantificada con tubos de turbidez prefijada, según lo estableció por McFarland en 1907”.



Ilustración N° 5 Estandarización del inóculo mediante el uso de la tarjeta de wickerham. Fuente:Gallegos (2014)

V. METODOLOGÍA

La Investigación Científica según Cortés & Iglesias (2004) está encaminada a profundizar el conocimiento que surge de la necesidad del hombre a dar solución de los problemas más acuciantes de la vida cotidiana, de conocer la naturaleza que lo rodea y transformarla en función de satisfacer sus intereses y necesidades; los enfoques más comunes en la metodología de la investigación son el enfoque cualitativo y cuantitativo; en este orden de ideas, la metodología empleada en esta investigación se sitúa desde el paradigma del enfoque cuantitativo.

La investigación es un conjunto de procesos sistemáticos, críticos y empíricos que se aplican al estudio de un fenómeno o problema; por lo tanto, se plantea un diseño experimental puro con técnicas de recolección de datos a partir de métodos de separación como la destilación y métodos instrumentales (cromatografía, espectrometría de masas) y métodos antimicrobianos de difusión en agar. Por consiguiente, las variables a considerar son de naturaleza continua.

5.1. Enfoque Metodológico

Según los autores Hernández *et al.* (2014), en este tipo de metodología, la recolección de datos se fundamenta en la medición de variables y conceptos contenidos en los objetivos y las hipótesis, la recolección se lleva a cabo mediante el uso de procedimientos estandarizados y aceptados por la comunidad científica.

El enfoque cuantitativo es un conjunto de procesos secuenciales y probatorios, por consiguiente, cada etapa precede a la siguiente y no se puede eludir ningún paso. El orden es riguroso, parte de una idea la cual va cogiendo forma a medida que se derivan objetivos y preguntas de investigación, se realiza revisión de la literatura y se construye un marco o una perspectiva teórica. De las preguntas se establecen hipótesis y se determinan variables; se traza un plan para probarlas (diseño); se miden las variables en un determinado contexto; se analizan las mediciones obtenidas utilizando métodos estadísticos, y finalmente se extraen una serie de conclusiones Hernández *et al.* (2014).

El tratamiento estadístico de esta investigación se realizó en primer lugar, para las determinaciones de rendimientos óptimos en los que fueron realizados por correspondencia del cumplimiento de objetivos (seleccionar la mejor técnica de extracción). Del mismo modo, para el análisis antibacterial se realizó la estimación matemática a los resultados de los valores aplicables a estos tratamientos y la obtención de datos estadísticos como la desviación estándar y la varianza. Para los resultados por CG-MS se concibe que las aproximaciones del *Datanálisis* confluyen de diversas bases de datos y por grados de correspondencia tanto de índices de retención como de espectros de masas (*peak-matching/peak quality*), por lo tanto, conllevan a identificaciones muy precisas de carácter presuntivo.

En cuanto a la naturaleza de las variables Hernández *et al.* (2014) plantea que en estudios con muestreos de datos (elementos) se estudian sus características clasificadas en cualitativas o atributos, expresadas por palabras y se cuantifican mediante el recuento o recuento. Las cuantitativas o variables expresadas en forma numérica, que pueden ser medidas (variable continua) o contadas (variable discreta).

El diseño experimental mostrado en la ilustración N°6, permitió estimar las variables de este estudio, es decir, con cantidades indeterminadas (variables continuas) y aquellas que admiten cantidades finitas (variables discretas) tabla N° 1.

Tabla 1 Naturaleza de las variables asignadas en este estudio Ríos y Rojas (2017)

Diseño metodológico	Variables	
	Continua	Discreta
Obtención y Rendimiento de los AE	Tiempo de extracción	Estado del material vegetal
	Masa de material vegetal	Técnicas de Extracción (HD, SD, MWHD)
	Masa de los AE	
Análisis por CG-MS	Tiempos de retención	Columnas capilares ortogonales
	Índices de Retención	Espectros de masas
	Temperatura (rampas de calentamiento programado)	Orden de Elución en CG
	Condiciones Cromatográficas	

	Porcentaje de concordancia en los espectros de masas Relación m/z Unidades de masa atómica para fragmentos	
Actividad Antibacterial	Concentraciones de Tratamientos (ppm) y de antibióticos de amplio espectro Halos de inhibición	Medios de Cultivo

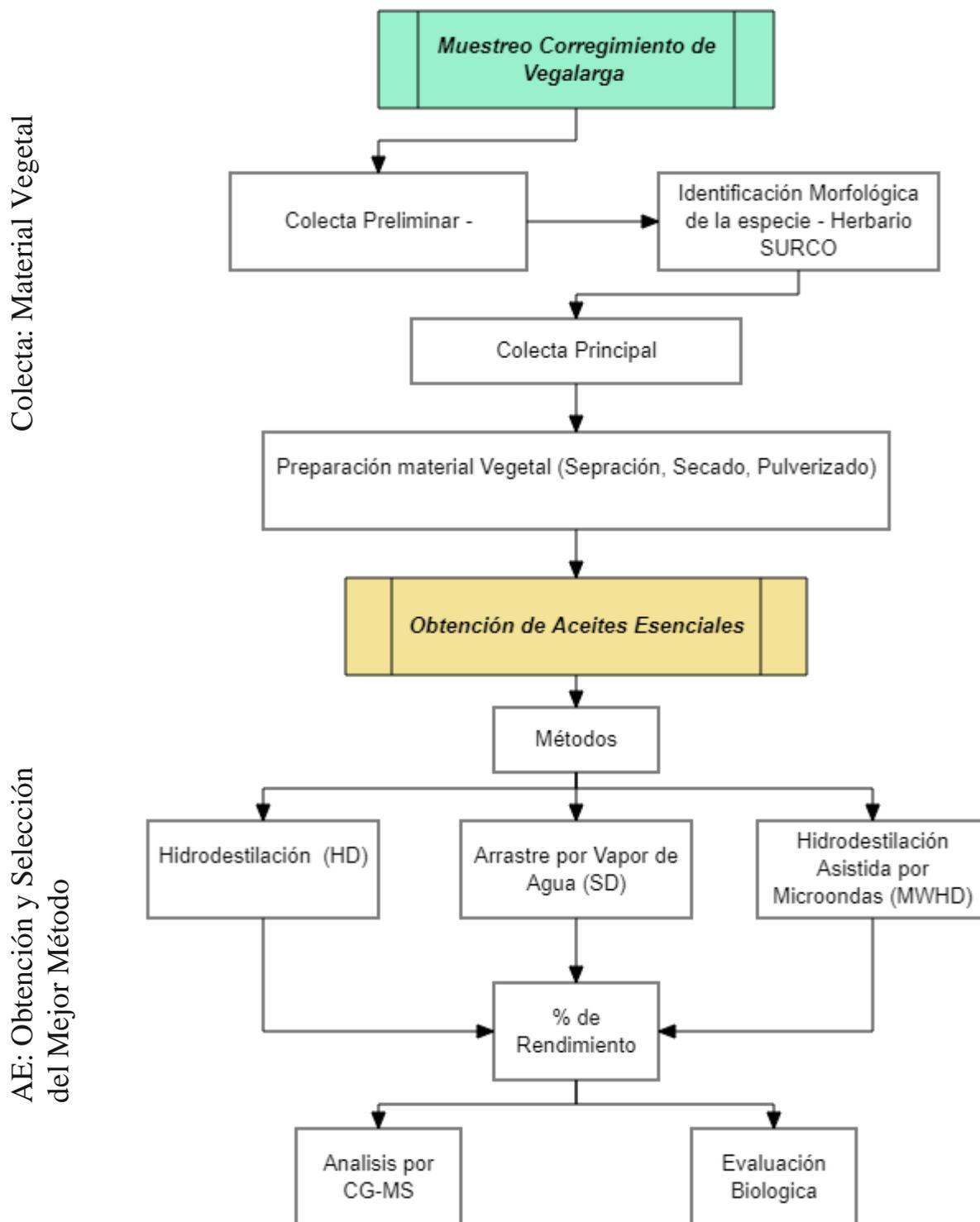


Ilustración N° 6 Diseño experimental para la obtención de los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth)

5.2. Colecta del Material Vegetal



Ilustración N° 7 Identificación morfológica en campo de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en el corregimiento de Vegalarga – Huila.

Durante este proceso (*ilustración N° 7*), se efectuaron dos colectas, inicialmente se realizó una recolección preliminar con el fin de realizar un muestreo de la especie vegetal para su respectiva identificación morfológica a nivel de laboratorio con ayuda del personal del herbario de la Universidad Surcolombiana “SURCO” y observar la disponibilidad de ésta en la zona, la colecta se ejecutó en zona boscosa y al costado de la carretera que atraviesa la finca Los Medios ubicada en el corregimiento de Vegalarga, Vereda La Espiga (N: 2°56’27,9” -W: 75°2’36,2”) a una elevación de 1319 m.s.n.m.; luego del proceso de identificación morfológica por parte del herbario se dio paso a la segunda colecta, se obtuvo un total de 1,58 arrobas equivalentes a 17,92 Kg de material vegetal compuesto principalmente por ramas y hojas, y en menor cantidad, frutos y flores; cabe destacar que el corte se realizó a manera de poda evitando perjudicar el desarrollo normal de la planta y procurando la conservación de la especie vegetal dado que en la actualidad no se encuentra evaluado su estado de conservación según datos plasmados en el Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia.

5.3. Preparado del Material

El material colectado fue previamente seleccionado para evitar la contaminación de otras posibles especies vegetales y separado según las estructuras de la planta (tallos, hojas, frutos y flores). Luego, se realizó una selección de las partes en buen estado. Las hojas y los tallos fueron sometidas al proceso de secado.

Para el proceso de secado, se empleó un horno Memmert modelo 30-750 con trampa de flujo de aire del 20%; perteneciente a la Universidad Surcolombiana, en donde se sometieron las muestras a una temperatura de 38 °C; dando paso al proceso de pulverización, el cual fue llevado a cabo mediante la implementación de un molino manual para granos marca modelo GNR marca Del Rey, tal como se muestra en la ilustración N° 8, este proceso se realizó con el fin de asegurar un contacto mayor entre el material vegetal y el agua.



Ilustración N° 8 Preparación del material vegetal, separación de estructuras y proceso de pulverización.

5.4. Métodos de Extracción

Los métodos de extracción (HD, SD, MWHD) fueron empleados bajo 3 variables constantes: cantidad de material vegetal empleado (50,00g) de las estructuras aéreas de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Tallos y Hojas), la cantidad inicial de agua

(1L) y finalmente el tiempo empleado para el proceso de obtención de hidrolatos (2 horas); por consiguiente, en el siguiente apartado se menciona el procedimiento empleado en cada una de las tres técnicas para la obtención de aceites esenciales.

5.4.1.1. 5.4.1 Hidrodestilación Simple (HD)

A continuación, en la ilustración N° 9 se muestra el montaje requerido para llevar a cabo el método de Hidrodestilación simple (HD), inicialmente se agregó la muestra de material vegetal (50 g) de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) pulverizada en un balón de fondo plano de 2000 mL y se le adicionó un (1)L de agua destilada; por medio de la cabeza de destilación (T) se realizó la conexión a un condensador recto por el extremo lateral previamente conectado al sistema de refrigeración y a un termómetro digital por el extremo superior, se procedió a encender el mechero Bunsen y a realizar la recolección del hidrolato mediante una probeta de 100 mL, cabe destacar que el agua se repuso en algunas ocasiones evitando la posible sequedad del material vegetal.



Ilustración N° 9 Montaje experimental para la obtención de AE por medio del método de HD.



Ilustración N° 10 Montaje extracción líquido-líquido, secado de fase orgánica y rotoevaporación. Tomada de: Ríos y Rojas, (2017).

Para la separación de los aceites esenciales del hidrolato se realizó el proceso de decantación por extracción líquido-líquido con diclorometano (CH_2Cl_2) al 99,9% (ilustración N° 10); posteriormente, una vez la fase acuosa y las fases orgánicas fueron separadas, se realizó el proceso de secado de las fases orgánicas ($\text{AE} + \text{CH}_2\text{Cl}_2$) empleando sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) el cual actúa como agente secante en soluciones orgánicas, dado que es un compuesto inerte encargado de eliminar trazas de agua que pueden aun encontrarse en una disolución, Laboratorio Discounter (2022); a continuación, se realizó el proceso de filtración a gravedad utilizando papel Whatman 1001-125. El filtrado se almacenó en un frasco de borosilicato de alto espesor con tapa enroscada y capacidad de 500 mL (evitando la pérdida de solvente altamente volátil).

La obtención del AE se realizó el proceso de rotoevaporación del filtrado empleando un equipo Hahn Shin modelo HS-2000NS, entre 70 y 90 rpm. El proceso de refrigeración requirió del uso constante de hielo asegurando una óptima condensación del solvente utilizado; mediante la bomba de recirculación se aseguró el flujo cíclico del agua evitando gasto y pérdida de agua de manera innecesaria.

Finalmente, los AEs obtenidos en el proceso de rotaevaporación se transfirieron desde el balón hacia viales de ámbar utilizando una pipeta Pasteur de vidrio y se procedió a realizar la debida rotulación del contenido. Se registró la masa del vial vacío y luego con el AE obtenido utilizando la balanza analítica Precisa LS220. Los aceites fueron llevados a refrigeración y guardados para los siguientes análisis.

5.4.1.2. 5.4.2 Hidrodestilación por Arrastre con Vapor de Agua (SD)

La extracción de aceites (AE) como se evidencia en la ilustración N° 11 se añadió al montaje de hidrodestilación simple, un balón adicional de 2000 mL con agua destilada la cual actúa como fuente externa generadora de vapor de agua, se dio inicio a este método controlando las mismas condiciones establecidas previamente (50 g de material vegetal; 1L de agua y 2 horas de ejecución), al igual que en la hidrodestilación simple, el hidrolato se sometió a un proceso de extracción líquido-líquido con diclorometano como solvente. Las fases orgánicas se reunieron, se deshidrataron con sulfato de sodio, se filtraron y rotaevaporaron. Se rotuló cada envase contenedor de aceite esencial y se les registró la masa a los mismos; se guardaron en el refrigerador para el análisis de la composición química por cromatografía de gases.



Ilustración N° 11 Montaje experimental para la obtención del AE por medio del método de SD.

5.4.1.3. 5.4.3 Hidrodestilación Asistida con Microondas (MWHD)

Se empleó como fuente generadora de calor un horno microondas convencional General Electrics® modelo JES11G adaptado con un acople de vidrio que atraviesa la parte superior del equipo conectando al balón de destilación insertado dentro del microondas con la cabeza de destilación, esta a su vez se conecta con el termómetro por el extremo superior y al tubo de condensación por el extremo lateral. Dentro del microondas se introduce el material vegetal (50,00 g) y se mezcla con un (1) L de agua destilada en un balón de destilación con capacidad de 2000 mL. Este proceso de destilación se realizó durante 2 horas a una potencia del 70 % con ciclos de funcionamiento en intervalos de 7 min de funcionamiento y 5 minutos de enfriamiento del equipo, lo anterior con el fin de no colapsar el equipo en un sobrecalentamiento que pueda averiar el equipo sometiéndolo a un trabajo continuo.



Ilustración N° 12 Montaje para la hidrodestilación simple asistida con microondas.

De igual forma que los métodos de hidrodestilación empleados con anterioridad, el hidrolato fue sometido a extracción líquido-líquido con diclorometano 99,9%, realizando el secado de la fase orgánica, filtrado y rotaevaporado. Por último, la masa de los AE fue

medida y se almacenaron para el análisis por cromatografía de gases en viales cubiertos con papel aluminio para proteger el producto de la luz.

5.5. Rendimiento

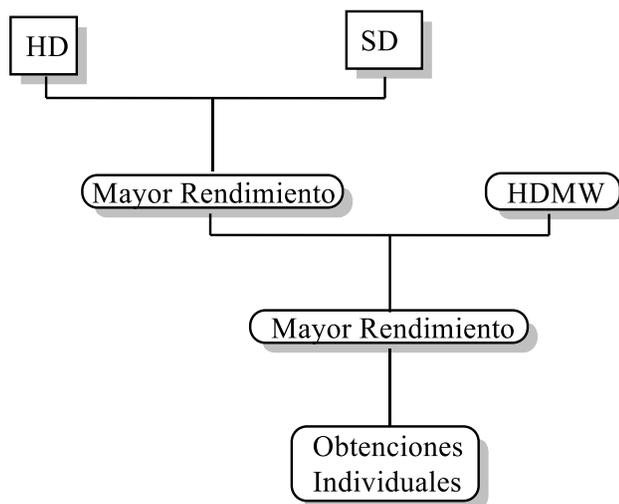


Ilustración N°13 Proceso de selección de rendimiento Ríos y Rojas (2017)

En la ilustración N°13 se evidencia el proceso de selección que se realizó para conocer la técnica más adecuada que permita el mayor rendimiento de los aceites esenciales. La determinación de la masa de los aceites se realizó mediante pesaje por (envase con AE menos envase vacío). Por último, se dividió entre la masa del material empleado en la extracción y teniendo en cuenta el factor 100%.

$$\% \text{ masa} = \left(\frac{\text{gramos de los AE obtenidos}}{\text{gramos de materia prima vegetal}} \right) \times 100$$

5.6. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas (CG-MS)

La caracterización química de los AE obtenidos de las estructuras aéreas (Hojas y Tallos) de *Siparuna gesnerioides* (Kunth), se realizó mediante cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas CG-MS, Gutiérrez y Droguet (2002) especifican que la CG-MS es muy implementada para la identificación de compuestos orgánicos volátiles dado que esta técnica posee un detector universal para la cuantificación de sustancias orgánicas donde son registrados el total de los iones generados (modo TIC); para su realización se tomaron cinco (5) microgramos de cada uno de los aceites y fueron enviadas a la Universidad del Quindío para su análisis instrumental, siguiendo la siguiente metodología:

- Solubilización de las muestras en diclorometano (CH_2Cl_2)
- Análisis instrumental en el cromatógrafo QP2010 ultra marca SHIMADZU, el cual está equipado con las siguientes condiciones; sistema de ionización de impacto electrónico a 70 eV para la detección por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Helio como gas portador a un flujo de 1mL/min.
- Las temperaturas del inyector y la línea de transferencia se ajustaron a 300°C y 285°C, respectivamente.
- La temperatura de la columna se ajustó inicialmente a 40°C manteniéndose allí por 1 min y luego gradualmente se incrementó hasta 260°C, a una velocidad de 3°C por minuto; se mantuvo por 1 min, luego se incrementó la temperatura a 310°C a una velocidad de 10°C por min manteniéndose por 5 min.
- Presión: 65.5 kPa
- Flujo total: 41 mL/min
- Flujo en columna: 1mL/min

- Las muestras se diluyeron 1:20 v/v en diclorometano (CH₂Cl₂), se inyectó 1µL en modo Split.
- Los componentes se identificaron por comparación relativa de tiempos de retención y espectros de masas de la biblioteca NIST11s.lib del equipo.

Cada cromatograma se encuentra acompañado por una tabla en la cual se encuentran representados los datos referentes a cada pico (compuesto) identificado por el espectro de masas, en la tabla se pueden apreciar los siguientes datos:

- No. Del Pico
- Tiempo de Retención
- Compuesto (Formula Química)
- Área del Pico
- Porcentaje de Área
- Altura del Pico
- Porcentaje de Altura
- Relación entre el área y la altura de cada pico.

A demás, se cuenta con el espectro tanto teórico como practico de los compuestos identificados el cual cuenta con el nombre, formula química, masa e índice de retención de Kovats.

5.7. Ensayos Biológicos

5.7.1. Preparación de los aceites esenciales

Para el proceso de preparación de soluciones del aceite esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) se empleó la ecuación:

$$ppm = \frac{mg \text{ Solute}}{L \text{ de disolución}}$$

Donde:

- mg de soluto corresponde al aceite esencial
- L corresponde al volumen de la disolución

Se midió la cantidad necesaria de aceite esencial de acuerdo con las concentraciones a emplear. Luego, la muestra se depositó en un balón aforado de 5mL el cual fue disuelta en tween 80 al 20%.

5.7.2. Preparación de Medios de Cultivo

Se dio inicio mediante la preparación del Agar Nutritivo con el fin de replicar la cepa bacteriana en cajas de Petri; de igual manera, se preparó en un tubo de ensayo un medio de agar nutritivo inclinado para la realización de la inoculación de la bacteria para la implementación del método de estandarización por turbidez en la escala de McFarland.

La preparación de medios de cultivo se realizó de tal manera en la que se contaba con un medio estándar comúnmente comercializado para el crecimiento óptimo de la bacteria gramnegativa *Salmonella enteritidis* como lo es el Agar Triptona-Soja (TSA) que es un medio para microorganismos tanto exigentes como no exigentes; aerobias o anaerobias.

Por otra parte, se efectuó la preparación de seis (6) medios de cultivo a base de extracto de pulpa de fruta y Agar-Agar; tres (3) de estos medios fueron preparados a base de frutas con manipulación previa provenientes de la despulpadora Archila (Maracuyá, Fresa y Guanábana); los otros tres (3) medios de cultivo fueron elaborados a base de frutas sin manipulación previa (Melón, Papaya y Tomate).

5.7.2.1. Agar TSA

En primer lugar, se realizaron los cálculos para la preparación del medio de cultivo, determinando la cantidad de agar TSA en un volumen de 75 mL de agua destilada para tres cajas de Petri. Por lo cual, se mezclaron 3,00 g de agar TSA con 75 mL de agua destilada en un Erlenmeyer de 100 mL, luego se procedió a la agitación manual del mismo para generar la homogenización del medio de cultivo, finalmente se selló con papel azúcar y se aseguró con cinta de enmascarar, se le colocó cinta indicadora para identificar las unidades esterilizadas y se llevó a la autoclave hasta llegar

a una presión de 115 KPa, por 15 minutos. Posteriormente, se apagó la autoclave y se abrió el pistón para liberar la presión *ilustración N° 14*.



Ilustración N°14 Preparación del medio de cultivo Agar TSA

Finalmente, el medio de cultivo se dejó enfriar a temperatura ambiente por unos minutos y se llevó a la cabina de flujo de aire en donde fue depositado de manera uniforme en tres (3) cajas de Petri desechables y esterilizadas, pasado 5 minutos se verificó la solidificación de los medios, los cuales se taparon y rotularon *ilustración N° 15*.



Ilustración N°15 Medios de cultivo servidos de TSA

5.7.2.2. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta sin Manipulación Previa

5.7.2.2.1. Agar-Agar con extracto de Melón (*Cucumis melo*)

Se realizó la obtención del extracto de la pulpa de fruta del melón sin manipulación previa. Inicialmente, se cortó la fruta en pequeños trozos en un mortero esterilizado y se estrujó para la obtención de sus respectivos jugos, los cuales fueron pasados a través de un filtro de tela esterilizado que permitiera obtener dichos extractos en un Beaker, *ilustración N° 16*.



Ilustración N° 16 Preparación del extracto de Melón (*Cucumis melo*) y preparación del medio

Una vez se obtuvo el extracto de Melón se realizaron los cálculos para la preparación del medio de cultivo, cantidad suficiente de preparación (csp) Agar-Agar y

el extracto de Melón para tres cajas de Petri, a 1,5 g de Agar-Agar se agregó 7,5 mL de extracto de pulpa y, se diluyó con 75 mL de agua destilada. La mezcla se agitó para lograr la homogenización del medio de cultivo y su solidificación a un pH entre 6 y 7, se registró los valores del pH utilizando un pH-metro (ver tabla N° 2); el Erlenmeyer que contiene la solución se selló con papel azúcar y se aseguró con cinta de enmascarar, se le colocó cinta indicadora para identificar las unidades esterilizadas y se llevó a la autoclave empleando una presión de trabajo de 115 kPa, por 15 minutos.

Tabla 2 pH del extracto de pulpa de Melón (*Cucumis melo*)

Melón (<i>Cucumis melo</i>)	
Sin Agar-Agar	Con Agar-Agar
6,55	6,83

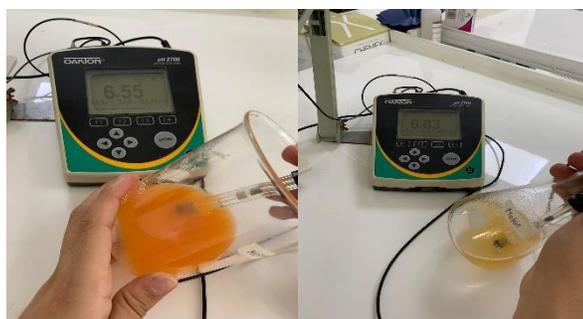


Ilustración N° 17 Medición de pH pulpa de Melón (*Cucumis melo*)

El medio de cultivo obtenido se fraccionó en tres cajas de Petri en uniformidad, en una cabina de flujo laminar, pasado 7 minutos se verificó se verificó la solidificación de los medios, los cuales se taparon y rotularon.

5.7.2.2.2. Agar-Agar con extracto de Tomate (*Solanum lycopersicum*)

En primer lugar, se realizó la obtención del extracto de la pulpa de fruta del tomate (*Solanum lycopersicum*) sin manipulación previa, el extracto de esta fruta se obtuvo primero extrayendo su pulpa carnosa con semillas y segundo cortando y estrujando la

fruta en pequeños trozos en un mortero esterilizado. Los jugos fueron pasados a través de un filtro de tela esterilizado que permitiera obtener dichos extractos en un Beaker.



Ilustración N° 18 Preparación del extracto del Tomate (*Solanum lycopersicum*) y preparación del medio

Se emplearon las mismas cantidades de Agar-Agar (1,5 g) y de extracto de tomate (7.5 mL) y se realizó el mismo procedimiento descrito para el melón (ilustración N° 18). En la tabla 3, se muestran los valores del pH del extracto de tomate con agar y sin agar; el tomate al presentar un pH inferior a 6 se le adicionó gota a gota una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 2.5% para garantizar la solidificación del medio con un pH entre 6 y 7; posteriormente, se continuó con el mismo procedimiento descrito para el melón.

Tabla 3 pH del extracto de pulpa de Tomate (*Solanum lycopersicum*)

Tomate		
Sin Agar	Con Agar	Con NaOH
4,05	4,24	6,35

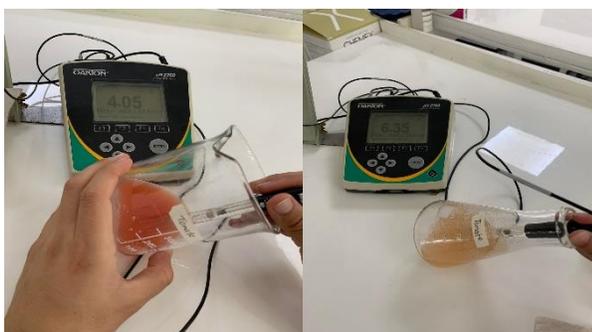


Ilustración N° 19 Medición de pH de la pulpa de Tomate (*Solanum lycopersicum*)

5.7.2.2.3. Agar-Agar con extracto de Papaya (*Carica papaya L*)



Ilustración N° 20 Preparación del extracto de Papaya (*Carica papaya L*) y preparación del medio

Para la preparación del medio con el extracto de Papaya, se empleó el mismo procedimiento descrito para el melón y Tomate (ilustración N° 20). En la tabla N°4; se muestran los valores de pH del extracto de Papaya sin agar y con agar. La papaya con el Agar-Agar presentó un pH de 5,23; al ser un pH inferior a 6 se le adicionó gota a gota una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 2.5% hasta pH entre 6 y 7 para garantizar la gelificación del medio (ilustración N° 21); finalmente, el medio se autoclavó-y después de 15 min se dejó enfriar a temperatura ambiente para su distribución en las 3 cajas de Petri.

Tabla 4 pH del extracto de pulpa de Papaya (*Carica papaya L*)

	Papaya	
	Con Agar	Con NaOH
Sin Agar		

5,07

5,23

6,85



Ilustración N° 21 Medición de pH pulpa de Papaya (*Carica papaya L*)

5.7.2.3. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta con Manipulación Previa (DESPULPADORA ARCHILA)

5.7.2.3.1. Agar-Agar con extracto de Maracuyá (*Passiflora edulis*)

En primer lugar, se realizó la obtención del extracto de la pulpa de fruta del Maracuyá (*Passiflora edulis*) la cual presentaba manipulación previa, por la despulpadora Archila de Neiva-Huila, la pulpa fue pasada a través de un filtro de tela previamente esterilizado que permitió obtener dichos extractos en un Beaker (ilustración N° 22).



Ilustración N° 22 Extracto de Maracuyá (*Passiflora edulis*) y preparación del medio

La preparación del Agar-Agar con el extracto de Maracuyá se llevó a cabo empleando el mismo procedimiento descrito para las frutas anteriores. El extracto de maracuyá con el Agar-Agar presentó un pH de 3,09 el cual se aumentó a 6,13 con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 2.5% (tabla 5, ilustración N° 23).

Tabla 5 pH del extracto de pulpa del Maracuyá (*Passiflora edulis*)

Maracuyá		
Sin Agar	Con Agar	Con NaOH
2,74	3,09	6,13



Ilustración N° 23 Medición de pH de Maracuyá (*Passiflora edulis*)

5.7.2.3.2. Agar-Agar con extracto de Guanábana (*Annona muricata*)

El extracto de la pulpa de fruta de la Guanábana la cual presentaba manipulación previa, por la despulpadora Archila de Neiva-Huila, se preparó tal como se encuentra descrito para las anteriores frutas.



Ilustración N° 24 Preparación del extracto de Guanábana (*Annona muricata*) y preparación del medio

La Guanábana con el Agar-Agar presentó un pH de 3,83, el cual se aumentó a 7,69 con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 2.5% (tabla N° 6, ilustración 25).

Tabla 6 pH del extracto de pulpa de Guanábana (*Annona muricata*)

Guanábana		
Sin Agar	Con Agar	Con NaOH
3,40	3,83	7,69



Ilustración N° 25 Medición de pH de Guanábana (*Annona muricata*)

5.7.2.3.3. Agar-Agar con extracto de Fresa (*Fragaria vesca*)

El medio de cultivo con el extracto de Fresa se preparó, siguiendo el mismo procedimiento descrito para las demás pulpas que fueron donadas por la empresa Archila.



Ilustración N° 26 Preparación del extracto de Fresa (*Fragaria vesca*) y preparación del medio

La Fresa con el Agar-Agar presentó un pH de 3,79. Para lograr la gelificación del medio se adicionó hidróxido de sodio al 2,5% hasta pH de 6,18 (tabla 7, ilustración N° 27).

En la ilustración N° 28 se muestran los medios de cultivo con los extractos preparados para llevar a cabo las pruebas antimicrobianas.

Tabla 7 pH del extracto de pulpa de Fresa (*Fragaria vesca*)

Fresa		
Sin Agar	Con Agar	Con NaOH
3,36	3,79	6,18



Ilustración N° 27 Medición de pH del extracto de fresa (*Fragaria vesca*)

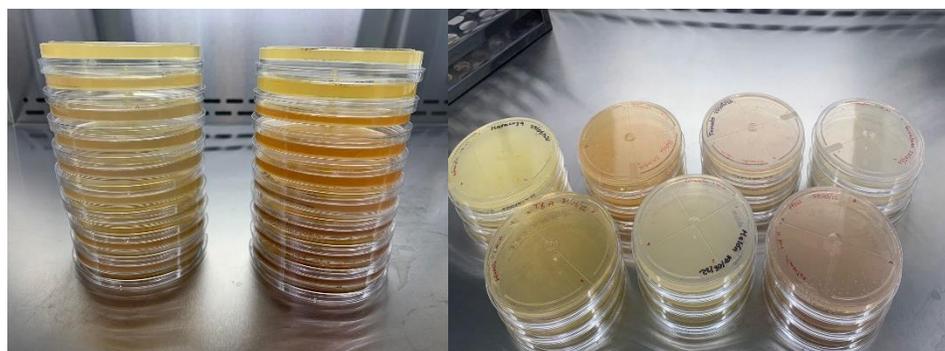


Ilustración N° 28 Medios de cultivos listos para siembra

5.7.2.4. Agar Nutritivo

Se determinó la cantidad de Agar Nutritivo en un volumen de 35 mL (25 mL para la caja de Petri y 10 mL para el medio de agar inclinado) de agua destilada para tres cajas de Petri. Por lo tanto, se pesaron 1,4 g de Agar Nutritivo en la balanza analítica; seguidamente, fueron depositados en un Erlenmeyer de 100 mL con 35 mL de agua

destilada, luego, la mezcla se agitó para lograr la homogenización del medio de cultivo, finalmente se selló con papel azúcar, se aseguró con cinta de enmascarar, se le colocó cinta indicadora para identificar las unidades esterilizadas y se llevó a la autoclave hasta llegar a una presión de 115 KPa por 15 min. Posteriormente, se apagó la autoclave y se abrió el pistón para liberar la presión.

Finalmente, se dejaron reposar los medios de cultivo a temperatura ambiente, donde se procedió a depositar el Agar nutritivo en una placa de caja de Petri desechable y esterilizada, de la misma manera, se agregó el medio en un tubo de ensayo previamente esterilizado, tal como se observa en la ilustración N° 29. Pasados 5 minutos, se verificó la solidificación del medio. Los tubos se taparon y rotularon.

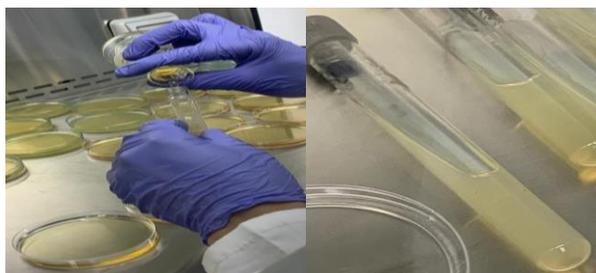


Ilustración N° 29 Medio de cultivo Agar Nutritivo

5.7.3. Preparación del Material para Pruebas Antimicrobianas

El material de laboratorio como pinzas, hisopos, tubos de ensayo y sensidiscos elaborados a base de papel filtro Whatman empleados en la preparación de los medios de cultivo y en la elaboración de las pruebas antimicrobianas de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) se esterilizaron en autoclave hasta una presión de 115 KPa (ilustraciones N° 30 y N° 31)



Ilustración N° 30 Preparación previa del material antes del proceso de esterilización



Ilustración N° 31 Proceso de Esterilización de los medios de cultivo y el material de laboratorio.

Cabe resaltar que las cajas de Petri empleadas como placas de cultivo son de material desechables, por lo cual se compraron selladas y esterilizadas para su previo uso.

5.7.4. Preparación del Inoculo

Para la replicación de la cepa bacteriana de *Salmonella enteritidis* se seleccionaron de 2 a 3 colonias bacterianas de un cultivo puro suministrado por el laboratorio de microbiología de la Universidad Surcolombiana, las cuales fueron inoculadas con el método de siembra con estrías por agotamiento para el caso del Agar Nutritivo en placa, el cual se realiza con el fin de renovar la cepa bacteria asegurando la eliminación de contaminantes que se puedan haber adquirido con la antigua cepa bacteriana durante el proceso de refrigeración; por otro lado, en el caso del medio de cultivo en tubo inclinado

o bisel con un asa en aro se inoculo la bacteria en la superficie del medio por siembra en estrías en forma de zigzag; finalmente, la cepa bacteriana de *Salmonella enteritidis* que fue sembrada en placa y bisel se llevó a la incubadora por 24 horas a una temperatura de 37°C.

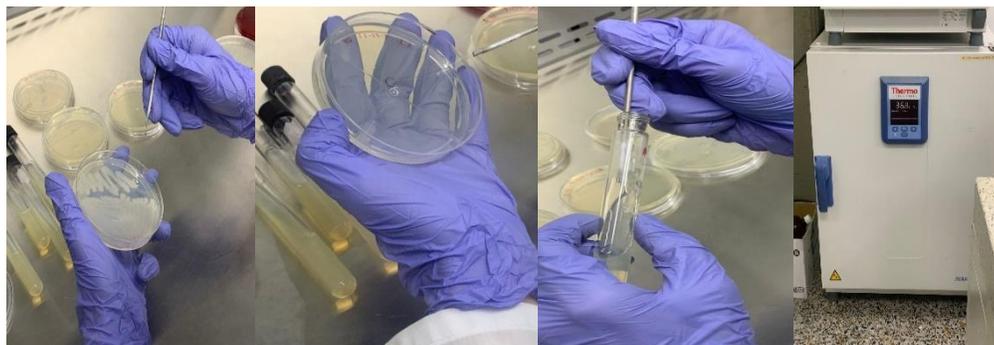


Ilustración N° 32 Preparación y siembra de la cepa bacteriana *Salmonella enteritidis* en placa y bisel.

5.7.5. Estandarización del Inoculo

Para el proceso de estandarización del inoculo, se tuvo en cuenta la tabla para la preparación de los estandares del patrón de McFarland para la determinación de un número aproximado de bacterias por mililitro; por lo tanto, se preparó el estandar a 0,5 en la escala de McFarland, la cual corresponde a 1.5 bacterias por cada mililitro.

Con relación a la preparación del estandar, se adicionó en un tubo de ensayo 0,5 mL de una solución de (BaCl_2) al 1.175% y 99,5 mL de una solución de (H_2SO_4) al 1% y se agitó hasta lograr homogenización de la solución, luego, se tomó el bisel o tubo inclinado con medio de Agar Nutritivo previamente inoculado con cepa bacteriana de *Salmonella enteritidis*, se le adicionaron 2 mL de solución salina comercial. Luego, se llevó a cabo la agitación mecánica en un Vortex Mixer, con la ayuda de la tarjeta de wickerham se realizó la comparación del estándar 0,5 de McFarland, se determinó la cantidad de solución salina en mL hasta alcanzar el mismo grado de propiedad óptica que la del estándar; el proceso de adición de solución salina se repitió cinco (5) veces seguidas hasta alcanzar 10 mL de solución salina que permitió el grado de turbidez del estándar 0,5 en la escala de McFarland (ilustraciones N° 33 y 34).



Ilustración N° 33 Proceso de estandarización de la cepa bacteriana *Salmonella enteritidis*



Ilustración N° 34 Preparación del estándar 0,5 de McFarland

5.7.6. Siembra de la Cepa Bacteriana *Salmonella enteritidis*.

Una vez se realizó la estandarización correctamente, se procedió a realizar el proceso de siembra masiva por extensión en placa en los medios de cultivo preparados con anterioridad (Agar TSA, Agar-Agar con extracto de Melón, Tomate, Papaya, Maracuyá, Guanábana y fresa), por lo tanto, se procedió a tomar 100 mL del inoculo bacteriano mediante el uso de una micropipeta previamente esterilizada y se agregó directamente dicha cantidad sobre cada uno de los veintiún (21) medios de cultivo; la técnica de extensión en placa de la muestra diluida se llevó a cabo con un hisopo esterilizado de manera masiva y uniforme por la superficie del agar, una vez inoculadas las placas, se dejó reposar el medio por 5 minutos, antes de instalar los sensidiscos (ilustración N° 35).



Ilustración N° 35 Siembra del inoculo de *Salmonella enteritidis* en placas

5.7.7. Pruebas de Sensibilidad Microbiana

Una vez terminado el proceso de siembra de la cepa bacteriana en las placas de agar, se procedió a la implementación de los sensidiscos previamente esterilizados en la autoclave, para estas pruebas se emplearon los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) cuyas disoluciones fueron preparadas con anterioridad empleando el aceite esencial de hojas obtenido por el método de arrastre con vapor de agua en concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm y el aceite esencial de tallos obtenido por el método de hidrodestilación simple a 50000 ppm, dichos aceites fueron colocados por medio de cuadrantes como se observa en la ilustración N° 37, el sensidisco colocado en el cuadrante número 1 corresponde al aceite esencial a una concentración de 5000 ppm, el cuadrante dos corresponde a una concentración de 10000 ppm, el cuadrante número 3 corresponde a la concentración de 50000 ppm y finalmente el cuadrante número cuatro corresponde al sensidisco impregnado del aceite esencial puro, cada prueba se realizó por duplicado y su respectiva prueba control como se observa en la ilustración N° 38, el control empleado corresponde al antibiótico comercial Ampicilina (Oxoid) 10 mcg/disco y como control negativo se empleó Tween 80 al 20% (ilustraciones N° 38)

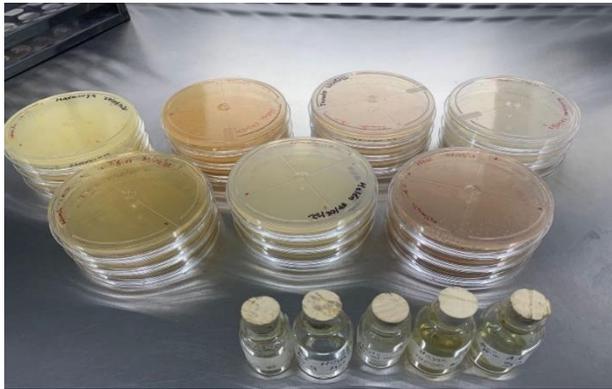


Ilustración N° 36 Medios de cultivos con *Salmonella enteritidis* y disoluciones de AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth)

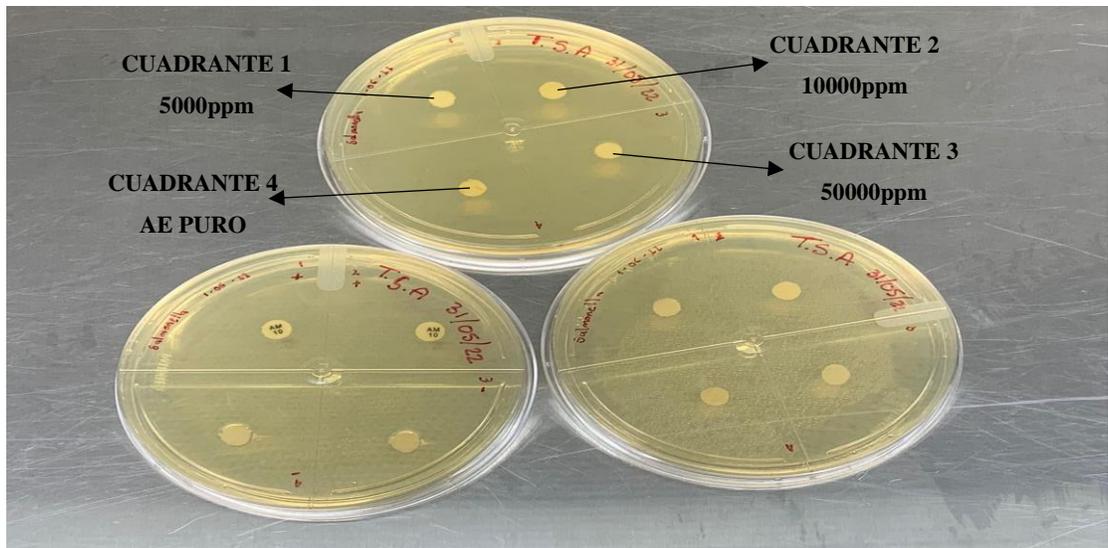


Ilustración N° 37 División de las placas por cuadrantes.

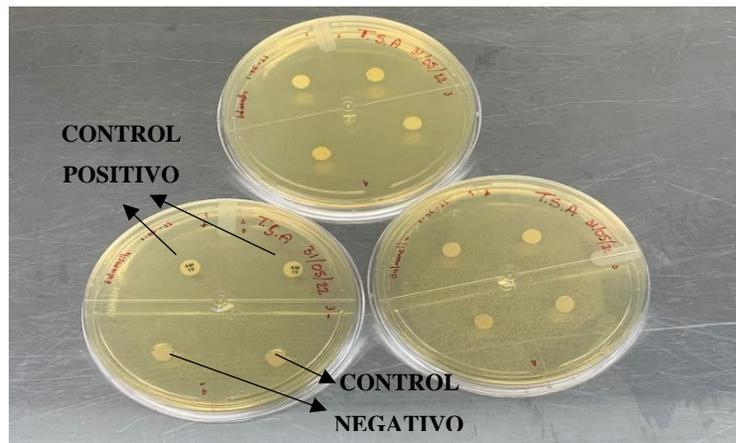


Ilustración N° 38 Placa con controles positivo y negativo

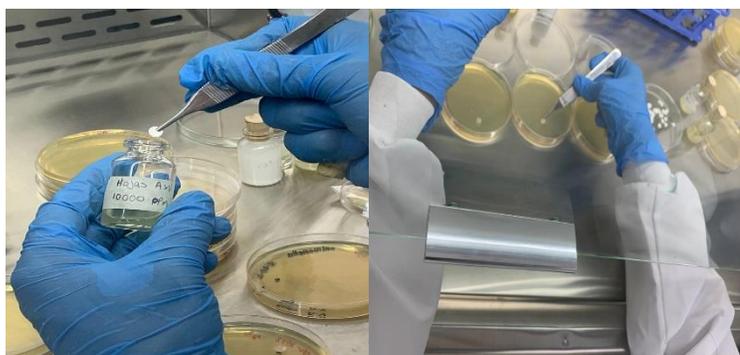


Ilustración N° 39 Impregnación de sensidiscos con AE

En el cuadrante número 4 de las placas de Agar TSA y Agar-Agar con extracto de Maracuyá se empleó el aceite esencial puro de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) de tallos por el método de hidrodestilación simple (ilustración N° 40).

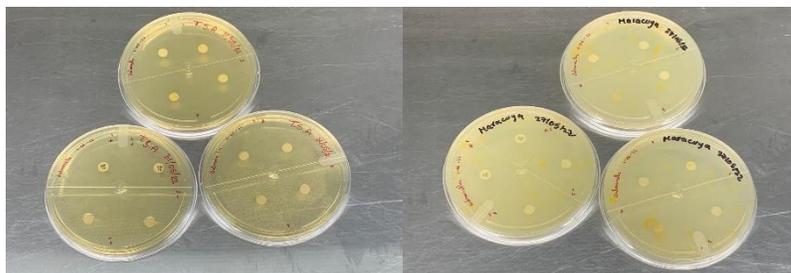


Ilustración N° 40 Placas con AE Puro (Tallos) por HD.

Por otra parte, para el Agar- Agar con extracto de Tomate y el Agar-Agar con extracto de Melón se empleó el aceite esencial puro de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) de hojas por el método de hidrodestilación simple (ilustración N° 41).

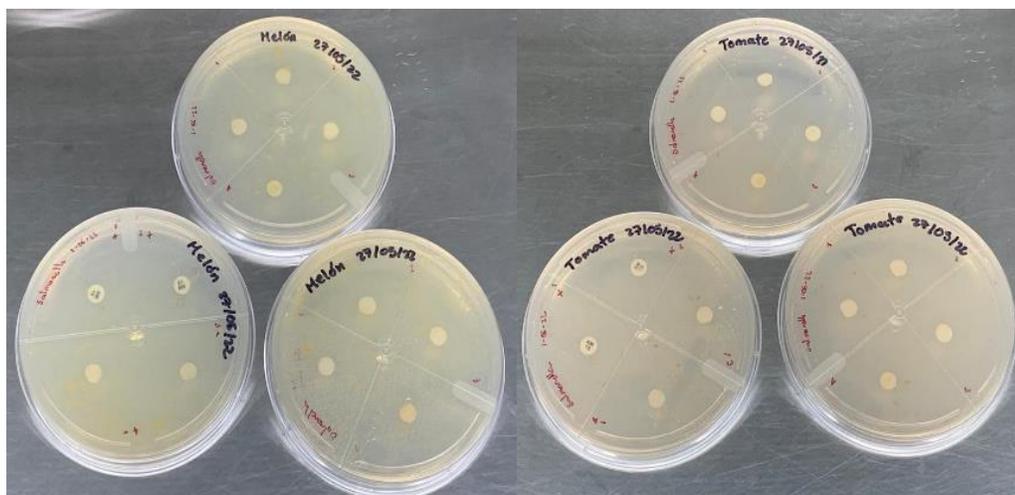


Ilustración N° 41 : Placas con AE Puro (Hojas) por HD.

Para el Agar- Agar con extracto de Fresa y el Agar-Agar con extracto de Guanábana se empleó el aceite esencial puro de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) de tallos por el método de hidrodestilación con arrastre por vapor de agua (ilustración N° 42).

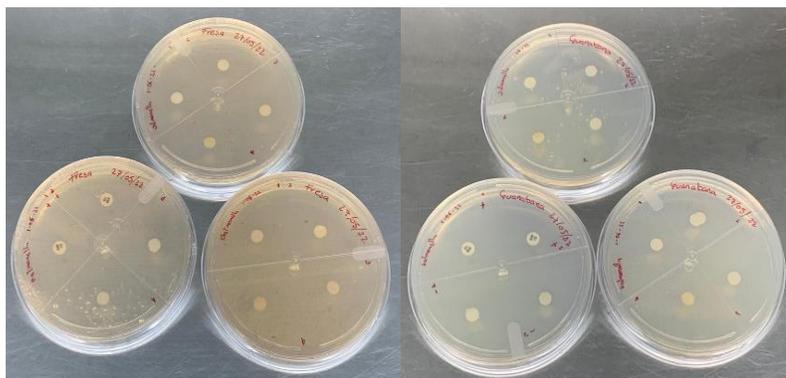


Ilustración N° 42 Placas con AE Puro (Ramas) por SD.

El Agar- Agar con extracto de Papaya se empleó el aceite esencial puro de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) de tallos por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas (ilustración N° 43).

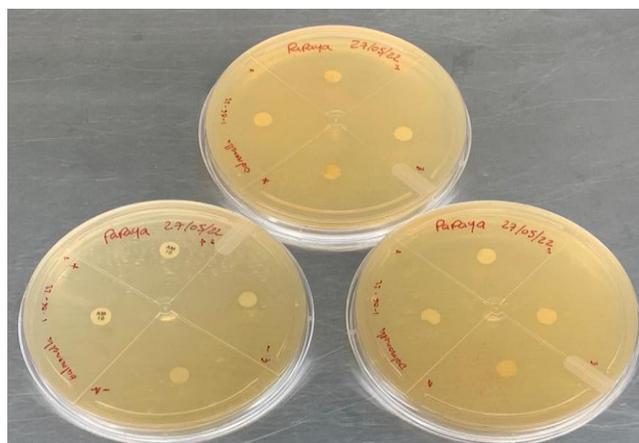


Ilustración N° 43 Placas con AE Puro (Ramas) por MWHD

Finalmente, una vez terminado el proceso de fijación de sensidiscos en los medios de cultivo, estos fueron llevados durante 24 horas a 37°C a la incubadora para el proceso de incubación de las cepas bacterianas de *Salmonella enteritidis* (ilustración N° 44).



Ilustración N° 44 Proceso de Incubación de *Salmonella enteritidis* en diversos medios de cultivo

5.7.8. Observación de Resultados de las Pruebas de Sensibilidad

Pasadas las 24 horas de incubación, se determinó si los sensidiscos ubicados en las cajas de Petri impregnados con los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) habían producido halos de inhibición contra la Ceba bacteriana de *Salmonella*

enteritidis. El halo de inhibición se compara con los controles positivos y negativos determinando sensibilidad o resistencia antimicrobiana de la bacteria gramnegativa frente a los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) a concentraciones de 5000 ppm, 10000 ppm, 50000 ppm y en estado puro.

5.7.9. Software “ImageJ”

Para determinar la medida en milímetros (mm) de los halos de inhibición en las placas de Petri se empleó el software “ImageJ” el cual es un programa de procesamiento de imagen digital que permite procesar, escanear y analizar imágenes; por lo tanto, para el proceso de toma de mediciones se introduce una foto de los sensibilizados que presentan halos de inhibición junto a un papel milimetrado que será empleado como medida de referencia permitiendo calibrar el sistema obteniendo medidas en unidades de mm; el software calcula el área, la media, la desviación estándar, la moda, el mínimo, el máximo y la longitud (ilustración N° 45). El tamaño del halo podrá determinar el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) frente a la bacteria gramnegativa *Salmonella enteritidis*.

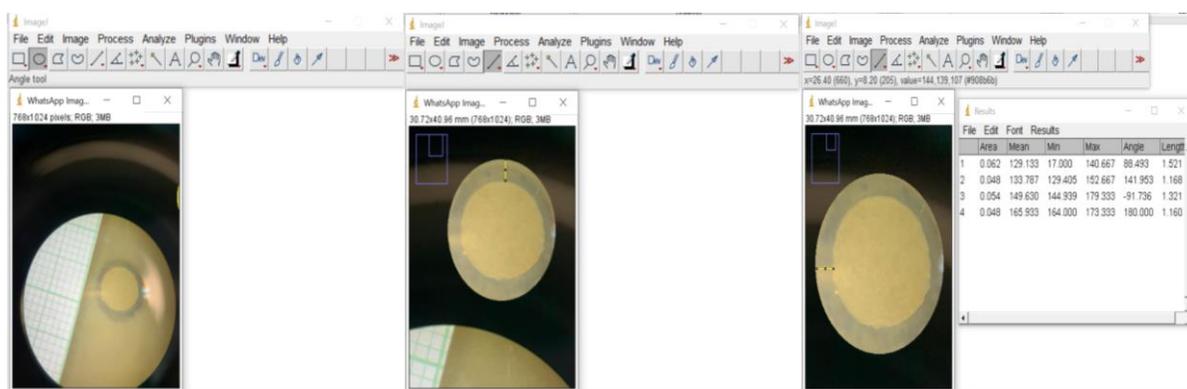


Ilustración N° 45 Software “J Image”

VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. Rendimiento de los Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth).

El porcentaje de rendimiento del AE obtenido por diferentes métodos de extracción física se reporta en la tabla N° 8.

Tabla 8 Comparación del rendimiento de los AE de material seco de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) con el método de obtención.

Método	Masa material vegetal (g)	Masa de los AE (g)	% Rendimiento
HD	50 g Hojas	1,0737	2,1474
HD	50 g Tallos	0,5320	1,0640
SD	50 g Hojas	0,3612	0,7224
SD	50 g Tallos	1,0688	2,1376
MWHD	50 g Hojas	1,8006	3,6012
MWHD	50g Tallos	0,7792	1,5584

De acuerdo en los resultados (tabla N° 8), el rendimiento de los aceites esenciales a partir de 50,0 g de cada estructura (tallos y hojas) de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC., mediante la técnica de hidrodestilación (HD), hidrodestilación por arrastre con vapor de agua (SD) e hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD), se logra apreciar que la técnica MWHD (3,6 %) permitió la mayor cantidad de aceite esencial a partir de las hojas de la planta en comparación con la técnica de hidrodestilación (2,1 %) y por arrastre con vapor de agua (0,72 %). Para los tallos, la técnica por arrastre con vapor de agua (SD) permitió el mayor rendimiento de aceite (2,13 %) en comparación con MWHD (1,55 %) y HD (1,06 %). Cabe destacar que, durante el proceso de extracción de AE hay algunos factores fundamentales que afectan de forma directa el rendimiento, los cuales pueden ser: el origen de la planta, el lugar donde fue colectada, la edad, el tamaño de muestra, a causa que, un tamaño menor permite una mejor transferencia de calor entre la especie y el agua permitiendo una mayor evaporización de los AE, asimismo la cantidad de materia prima, agua o vapor, temperatura y presión Villalta (2013).

Estos datos contrarrestan lo estipulado por Montoya (2010) argumento en el escrito que la mayoría de los AE presenta un rendimiento no mayor al 1%. No obstante, los estudios realizados, Mahecha (2010), de los aceites esenciales de *Siparuna sessiliflora* no presentan un margen comparativo del rendimiento que permitan hacer aproximaciones de la cantidad de aceites obtenidos de la familia *Siparunaceae*, cabe anotar que en la actualidad no se han encontrado otros estudios que sirvan como referente. Dicho lo anterior, se logra llegar a la conclusión que los AE de esta especie presentan un rendimiento mayor al de otras especies según lo estipulado por Montoya (2010), siendo este el primer estudio que reporta el porcentaje de rendimiento de AE's para la especie *Siparuna gesnerioides*.

Siendo las técnicas de hidrodestilación asistida por microondas (MWHD) e Hidrodestilación simple (HD) las que permitieron obtener un mayor porcentaje de rendimiento de AE de las hojas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth), en contraste con las técnicas de Hidrodestilación por Arrastre con Vapor de agua y la destilación asistida por radiación microondas para los tallos, se logra determinar que esta especie produce mayor cantidad de aceites esenciales en comparación con otras especies de *Siparuna*, tal como se reporta en la literatura científica. Según lo reportado por Mahecha (2010), el rendimiento de los Aceites esenciales de *Siparuna sessiliflora* expresado en porcentaje en gramos de aceite obtenido por cada 100 g de muestra, se encontró entre 0.12% y 0,17% para hojas y 0.11% y 0,14% para frutos. Considerando el interés de los AE en el ámbito industrial, se puede considerar a la especie vegetal *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A, DC., como una especie promisoría para la comercialización de sus metabolitos constituyentes; además cabe destacar que toma mayor valor al considerar que esta especie vegetal presenta características de plantas de cultivo.

6.2. Características Organolépticas de los Aceites

El Aceite Esencial de los tallos de *Siparuna gesnerioides* obtenido por medio de la técnica de hidrodestilación simple (HD) presentó un color amarillo, un olor similar al limón y una textura poco viscosa como se puede apreciar en la ilustración N° 46; por

otra parte, el aceite esencial perteneciente a las hojas presentó un color amarillo intenso y su textura más viscosa en comparación con el AE de tallos como se puede apreciar en la ilustración 47.



Ilustración N° 46 Aceite Esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Tallos). Técnica HD

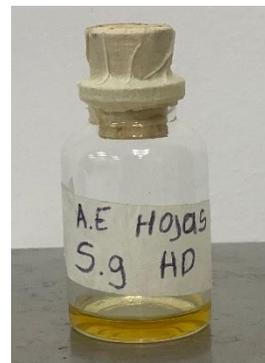


Ilustración N° 47 Aceite Esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Hojas). Técnica HD

En contraste, el Aceite Esencial de los tallos obtenido por medio de la técnica de hidrodestilación por Arrastre con Vapor de Agua (SD) presentó un color amarillo intenso con el característico olor a limón y una textura altamente viscosa como se puede apreciar en la ilustración N° 49; por otra parte, el aceite esencial perteneciente a hojas presentó un color amarillo claro y una textura poco viscosa en comparación con el AE de los tallos, como se puede apreciar en la ilustración N° 48.

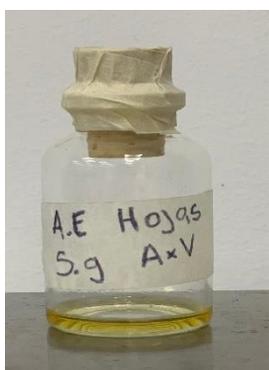


Ilustración N° 48 Aceite Esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Hojas). Técnica SD

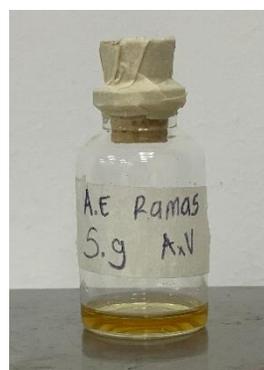


Ilustración N° 49 Aceite Esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Tallos). Técnica SD

Los aceites esenciales de las partes aéreas (Tallos y Hojas) de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenidos por medio de la técnica de hidrodestilación Asistida con Microondas (HDMW) presentaron las siguientes características: Para los tallos, el aceite mostró un color amarillo verdoso, con el característico olor a limón y una textura viscosa como se puede apreciar en la ilustración N° 50; por otra parte, el aceite esencial perteneciente a hojas presentó un color amarillo más intenso con una textura más viscosa en comparación con el AE de tallos, como se puede apreciar en la ilustración N° 51.



Ilustración N° 50 Aceite Esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Tallos). Técnica MWHD



Ilustración N° 51 Aceite Esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) (Hojas). Técnica MWHD

Al comparar los resultados de los seis aceites esenciales de los tallos y las hojas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenidos por los tres diferentes tipos de destilación (Hidrodestilación simple, Hidrodestilación por arrastre de vapor con agua e Hidrodestilación asistida por microondas) (ilustraciones N° 52, 53); se concluye que, el aceite esencial de las hojas obtenido por el método de hidrodestilación simple tiene un color amarillo más intenso y de mayor viscosidad en comparación con las otras dos técnicas. Por otro lado, en la ilustración N° 54 se observa que el aceite esencial obtenido de los tallos por la técnica de hidrodestilación por arrastre con vapor de agua presentó mayor intensidad en el color y textura que los aceites obtenidos por las otras dos técnicas.



Ilustración N° 52 Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth)



Ilustración N° 53 Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Partes Aéreas (Hojas)



Ilustración N° 54 Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) Partes Aéreas (Tallos)

6.3. Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas de los Aceites Esenciales *Siparuna gesnerioides* (Kunth).

Para los análisis de la composición química de los aceites esenciales de la especie *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por CG-MS, se obtuvieron un total de cinco perfiles cromatográficos correspondientes a los aceites de las hojas por la técnica de hidrodestilación y por la técnica de arrastre con vapor de agua y a los aceites de los tallos por la técnica de hidrodestilación, por arrastre con vapor de agua y por destilación asistida por microondas. El cromatograma del aceite obtenido de las hojas por la técnica de destilación asistida por microondas no mostró picos cromatográficos a las condiciones empleadas para los demás aceites.

El análisis de la composición química de cada uno de los AE's se realizó con base en los tipos de compuestos identificados en los cromatogramas y espectros de masas. Se

realizó una comparación con los aceites esenciales reportados en otras especies de *Siparunas* por otros autores de la literatura científica. En todos los cromatogramas se detallan los compuestos obtenidos en función de su abundancia registrada por el detector de masas y el valor de los tiempos de retención.

Stashenko (2009) reporta que los AE están compuestos principalmente por sustancias volátiles mayoritariamente, los cuales en su gran mayoría corresponden a compuestos de naturaleza terpénica; sin embargo, los resultados arrojados por los diferentes cromatogramas demuestran que son muy pocos los compuestos de naturaleza terpénica, por el contrario en su gran mayoría están conformados por compuestos de naturaleza alcohólica e hidrocarburos alifáticos como alcanos, alquenos, cetonas y en algunos casos ácidos.

6.3.1. Cromatograma de gases CG-MS del aceite esencial de las hojas de *S. gesnerioides* (Kunth) por Hidrodestilación (HD).

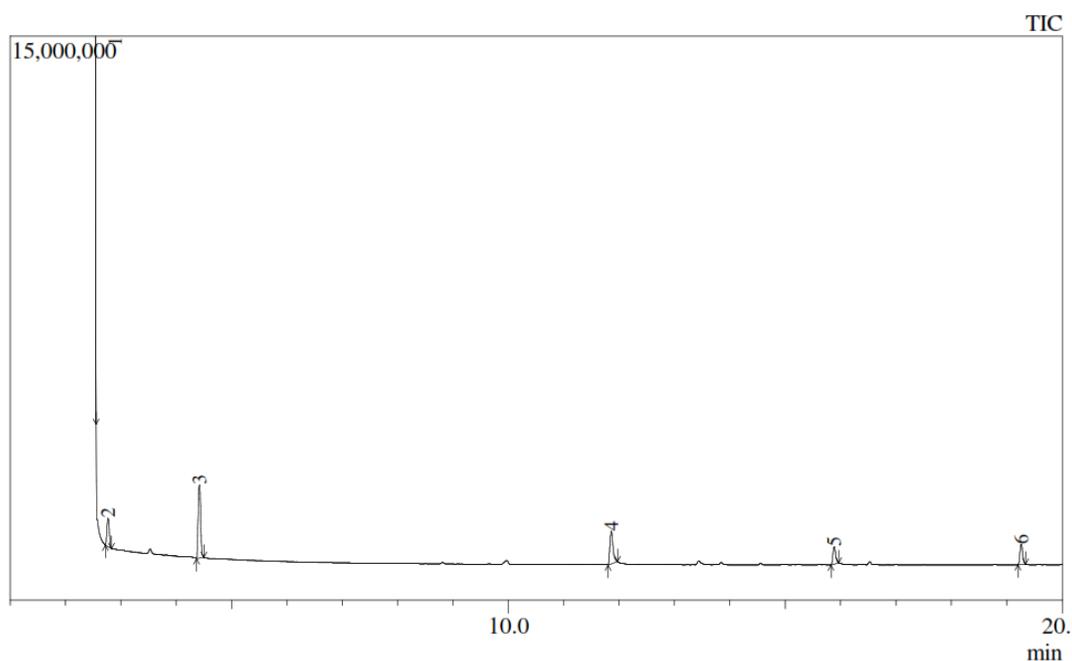
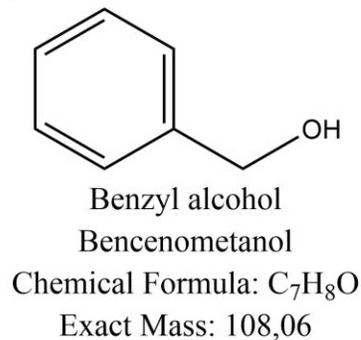
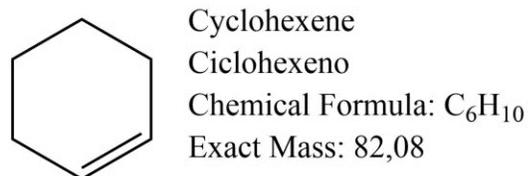
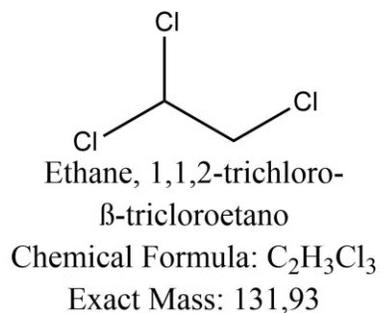
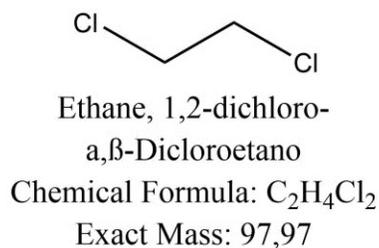


Ilustración N° 55 Cromatograma CG-MS del aceite esencial de las hojas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por HD

El cromatograma CG-MS (ilustración N° 55) corresponde al AE de las Hojas obtenido por Hidrodestilación (HD), evidenciando 6 picos con tiempos de retención desde cero (0) hasta 20 minutos; mediante el espectro de masas se identificó la composición química de cada uno de los compuestos presentes en el AE, los componentes principales tiene grupos funcionales de cetonas, alcoholes, alcanos halogenados y alquenos; tal y como se evidencia en la tabla 9 y en la ilustración N° 56.

Tabla 9 Composición química del AE de las Hojas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por el método de hidrodestilación.

Pico	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	Base m/z	Área%	I Kovats
1	2,516	1,2-dicloroetano	65	62,13	727
2	2,772	Ciclohexeno	67	5,53	736
3	4,422	1,1,2-tricloroetano	61	15,07	791
4	11,86	Alcohol bencílico	79	8,59	1099
5	15,886	1-Nonanol	56	4,1	1124
6	19,262	2-Decanona	58	4,59	1295
				100	



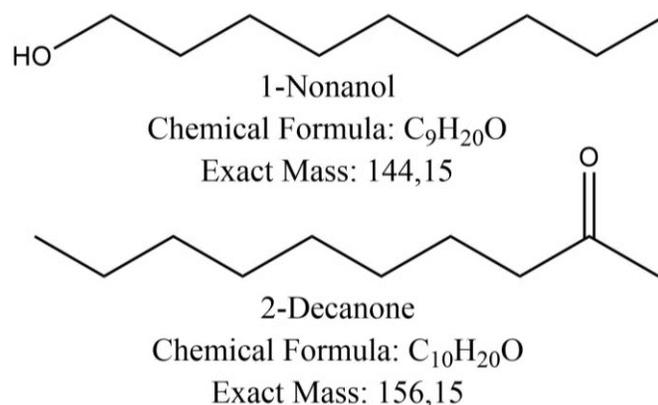


Ilustración N° 56 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS del aceite esencial de las hojas de *Siparuna gesnerioides* por HD

El espectro de masas de cada compuesto en el aceite esencial permitió identificar la estructura química de cada constituyente, mediante el pico de ion molecular y los picos fragmento.

6.3.1.1. 2-Decanona

La 2-Decanona presenta un olor floral a limón siendo un líquido incoloro, es una metilcetona en el que los hidrógenos de metileno en la posición 2 se reemplazan por un grupo oxo. Tiene un papel como metabolito vegetal. Deriva de un hidruro de un decano, siendo insoluble en agua y soluble en alcohol CNIB (2022).

La 2-decanona es un producto natural que se encuentra en *Cichorium endivia*, *Curcuma aeruginosa*, *Tetradium glabrifolium*, además, ha sido reportada como compuesto mayoritario en los aceites esenciales las hojas de la *Siparuna guianensis* Noriega et al. (2014) lo que demuestra su presencia en este género, además, cabe destacar que existen varios informes donde se reporta la presencia de la 2-undecanona y 2-nonanona como los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Ruta chalepensis* y los responsables de su actividad repelente y larvicida, Andrade *et al.* (2017).

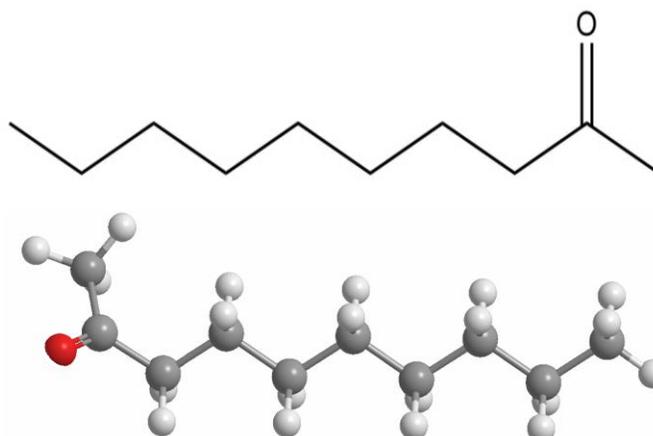


Ilustración N° 57 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de 2-Decanona obtenidos por medio de ChemDraw

El compuesto 2-Decanona mostró un pico de ion molecular m/z , de 156 uma y los picos fragmento con valores de m/z de 25, 41, 43, 58, 71, 85, 113, 127, 141 que se encuentran presentes tanto en el espectro experimental (ilustración N° 58) como en el teórico (ilustración N° 59).

Peak#:6 R.Time:19.262(Scan#:5029)
 MassPeaks:24
 RawMode:Averaged 19.257-19.270(5028-5032)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

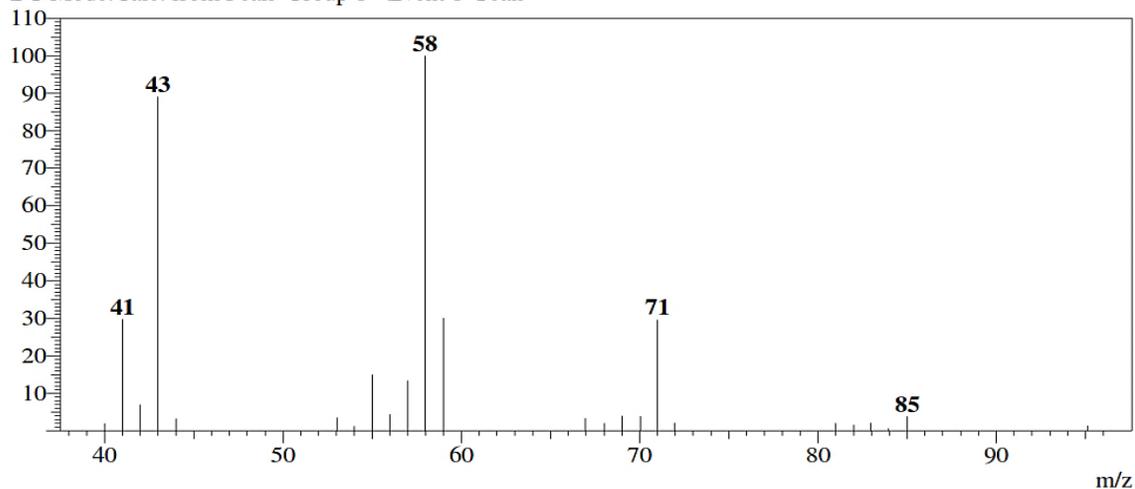


Ilustración N° 58 Espectro de masas experimental para la 2-Decanona presente en el AE de *S. gesnerioides*.

Hit#:1 Entry:10340 Library:NIST11s.lib
SI:94 Formula:C10H20O CAS:693-54-9 MolWeight:156 RetIndex:1151
CompName:2-Decanone \$\$ Decan-2-one \$\$ Methyl octyl ketone \$\$ n-C8H17COCH3 \$\$ Methyl n-c

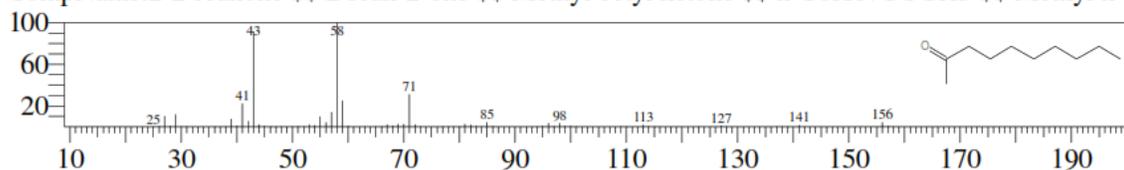


Ilustración N° 59 Espectro de Masas Teórico de la 2-Decanona arrojado por la librería NIST11s.lib

La 2-Decanona presenta un índice de retención de kovats experimental de 1295, un valor cercano al suministrado por la biblioteca NIST11s.lib del espectrómetro de masas, 1151 para el índice de retención de kovats (RetIndex) en la ilustración N° 59; en contraste, en la base de datos del libro web de química del Nits, SRD 69 se evidencia que, el valor del índice de retención varía según las condiciones en las cuales se calcule este valor, entre las más comunes se encuentra el tipo de columna y la polaridad de la fase estacionaria (NIST, 2021).

6.3.2. Cromatograma CG-MS del aceite esencial de los tallos secos de *S. gesnerioides* (Kunth) por Hidrodestilación (HD).

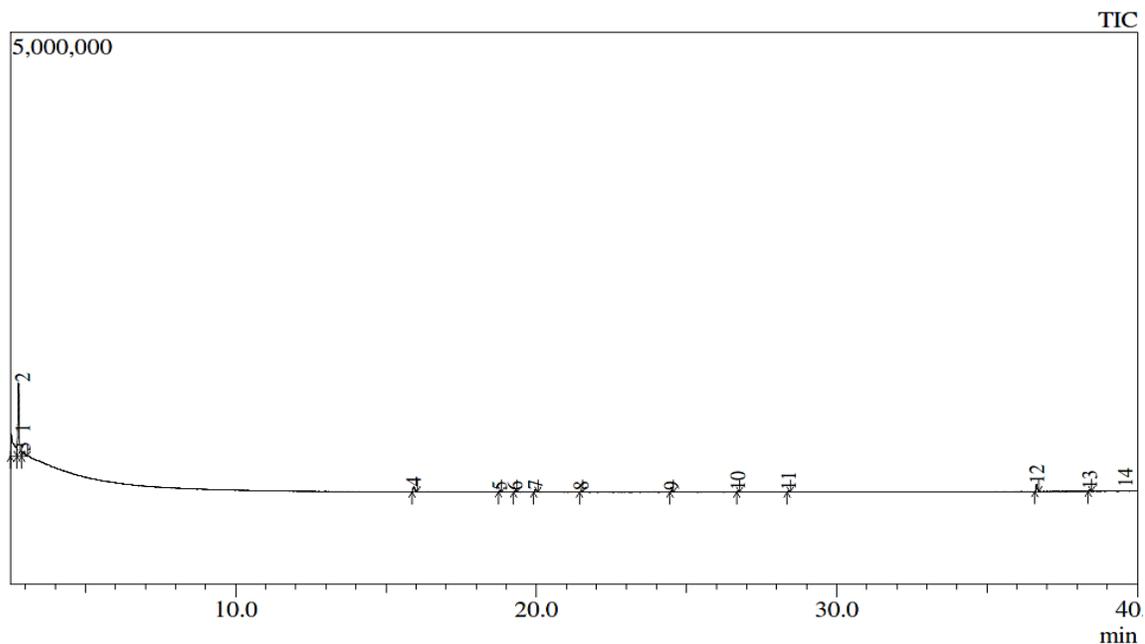


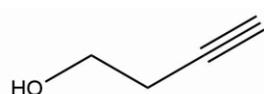
Ilustración N° 60 Cromatograma CG-MS del aceite esencial de los tallos secos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth). por HD

El cromatograma CG-MS (Ilustración N° 60) corresponde al AE de los tallos obtenido por Hidrodestilación (HD), se evidencia 14 picos con tiempos de retención desde cero (0) hasta 40 minutos; mediante el espectro de masas se identificó la composición química de cada uno de los compuestos presentes del AE, los componentes principales tiene grupos funcionales de éteres, aldehídos, ácidos, alcoholes, alcanos y alquenos; tal y como se evidencia en la tabla 10 y en las ilustraciones N° 61 y 62.

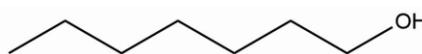
Tabla 10 Composición química del AE de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por el método de hidrodestilación

Pico	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	Base m/z	Área%	I Kovats
1	2,532	3-Butin-1-ol	40	30,02	728
2	2,772	Ciclohexeno	67	46,67	736
3	2,917	3-Butin-1-ol	40	4,89	740
4	15,924	1-Heptanol	56	3,89	1175
5	18,787	3,7-dimetil-1-Octeno	41	0,67	1277

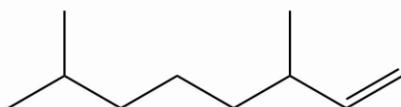
6	19,297	2-metilpentanal	43	0,88	1296
7	19,977	Ácido 2-propenoico, éster 2-metil-, 1-metilefílico	69	1,85	1321
8	21,488	1-isociano-butano	55	0,53	1376
9	24,507	Óxido de Propileno	58	1,04	1494
10	26,714	1-nitropropano	41	0,57	1586
11	28,398	Propano, 2-bromo-	43	0,69	1660
12	36,656	1-Fluorononano	43	4,37	2068
13	38,423	Hidroperóxido de terc-butilo	41	0,86	2166
14	40,129	2,2-dimetilbutano	43	1,99	2265
15	44,387	1-Bromoeicosano	57	1,08	2530
				100	



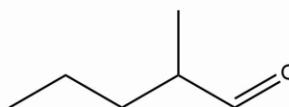
3-Butyn-1-ol
2-hidroxietilacetileno
Chemical Formula: C_4H_6O
Exact Mass: 70,04



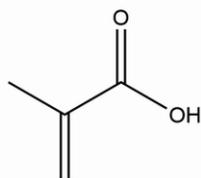
1-Heptanol
Heptyl alcohol
Chemical Formula: $C_7H_{16}O$
Exact Mass: 116,12



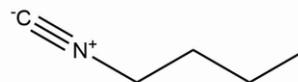
1-Octene, 3,7-dimethyl-
1-octeno, 3,7-dimetil-
Chemical Formula: $C_{10}H_{20}$
Exact Mass: 140,16



Pentanal, 2-methyl-
Valeraldehído
Chemical Formula: $C_6H_{12}O$
Exact Mass: 100,09



2-Propenoic acid, 2-methyl-
Ácido metacrílico
Chemical Formula: $C_4H_6O_2$
Exact Mass: 86,04



Butane, 1-isociano-
Ácido metacrílico
Chemical Formula: C_5H_9N
Exact Mass: 83,07

Ilustración N° 61 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* por HD

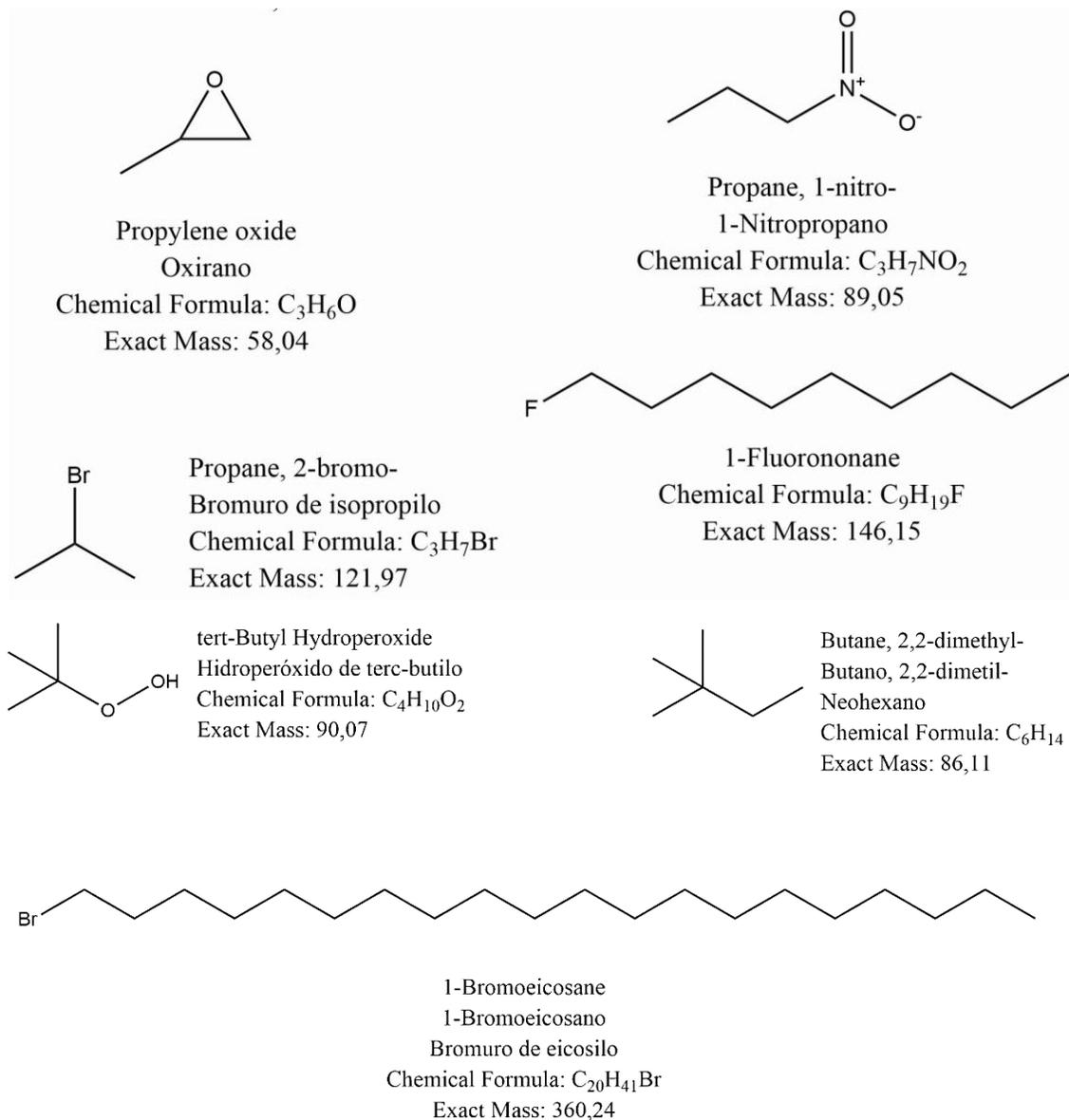


Ilustración N° 62 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* por HD

El aceite esencial de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por hidrodestilación, demostró la presencia de varios compuestos de interés, estando en mayor presencia el Ciclohexeno (46%) y el 3-butin-1-ol (30 %).

Mediante la observación de los resultados arrojados por el espectro de masas de cada aceite esencial, se logró identificar la estructura química de cada compuesto y sus

constituyentes, mediante el pico de ion molecular y los picos fragmento, tal como se muestra a continuación para el hidroperóxido de *ter*-butilo.

6.3.2.1. Hidroperóxido de *ter*-butilo (TBHP)

Es un compuesto conformado por un hidroperóxido de alquilo en el cual el grupo alquilo es *terc*-butilo; es un líquido acuoso inoloro e incoloro, que presenta una densidad menor al agua lo que le permite flotar y disolverse lentamente en esta, es ampliamente empleado en una gran variedad de procesos de oxidación dado que presenta propiedades como agente antioxidante y antimicrobiano.

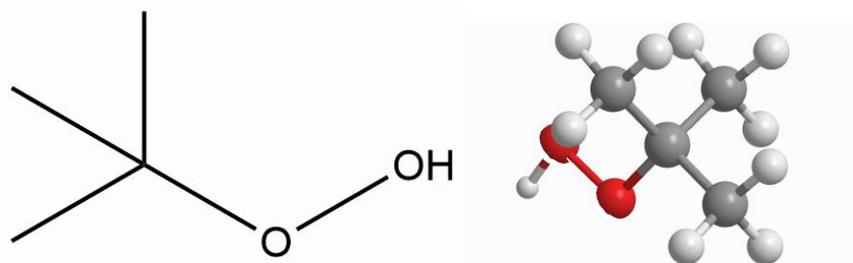


Ilustración N° 63 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de Hidroperóxido de *terc*-butilo obtenidos por medio de ChemDraw

Según la bibliografía consultada, no se han encontrado indicios de la presencia del Hidroperóxido de *ter*-butilo en aceites esenciales, sin embargo, cabe aclarar que posee propiedades antioxidantes y dentro de la familia *Siparunaceae* se han encontrado diversas especies con propiedades antioxidantes como es el caso de la *Siparuna sessiliflora* en la cual se ha reportado la presencia del compuesto hidroxibutilanisol Mahecha (2010), además, en la química orgánica durante la formación de los carbocationes presentes en diversos productos naturales el catión *ter*butilo es terciario por lo cual su carga es distribuida sobre cuatro átomos lo que le genera una mayor estabilidad y un menor requerimiento energético para formarse; en el caso del catión *ter*butilo presenta mayor estabilidad que el *isopropilo* y éste que el *etilo*; si durante la producción de una molécula se pudiera considerar la posible formación de dos

carbocationes, el que se formara será el más estable en este caso el terbutilo Autino *et al.* (2013).

Este compuesto arrojó como resultado 41 una según el pico de ion molecular m/z , y los picos de fragmentación con valores de m/z de 41, 43, 55, 57, y 73, que se encuentran presentes tanto en el espectro experimental (ilustración N° 64) como en el teórico (ilustración N° 65) al igual que la similitud entre los índices de retención de Kovats tanto experimental (2166) como teórico (2166) suministrado por la biblioteca NIST11s.lib (ilustración N° 65).

Peak#:13 R.Time:38.423(Scan#:10777)
MassPeaks:6
RawMode:Averaged 38.417-38.430(10776-10780)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

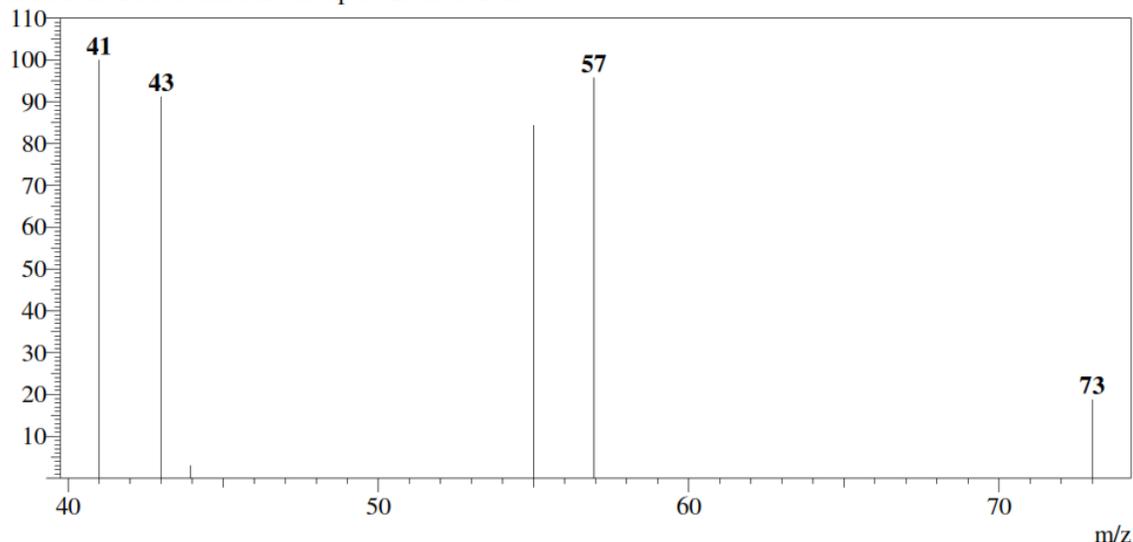


Ilustración N° 64 Espectro de masas experimental para el Hidroperóxido de terc-butilo presente en el AE de *S. gesnerioides*.

Line#:13 R.Time:38.420(Scan#:10777) Retention Index:2166 MassPeaks:6
RawMode:Averaged 38.417-38.430(10776-10780) BasePeak:41.00(5695)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

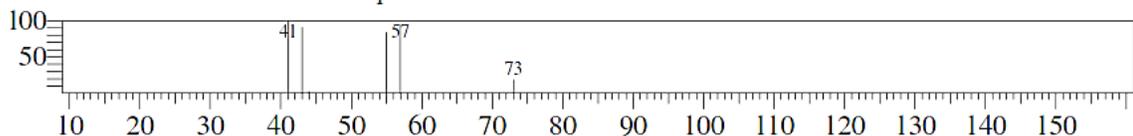


Ilustración N° 65 Espectro de masas teórico del Hidroperóxido de terc-butilo.

6.3.3. Cromatograma de gases GC-MS del AE de las hojas secas de *S.*

gesnerioides (Kunth) por Arrastre con Vapor de Agua (SD)

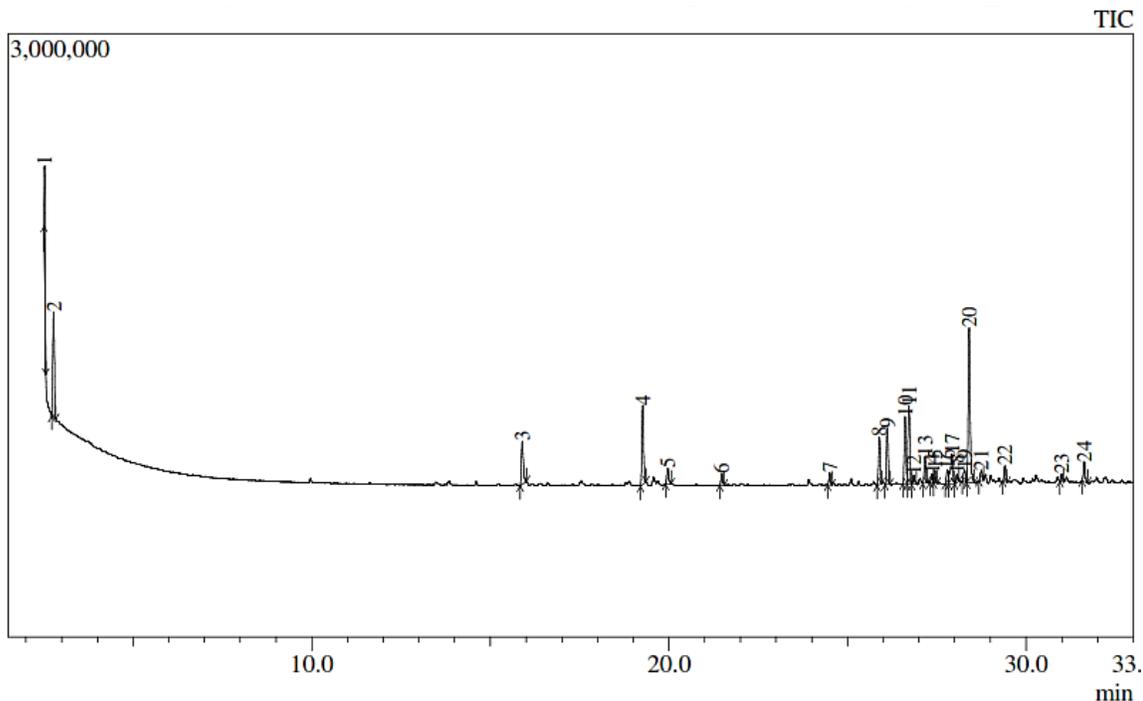


Ilustración N° 66 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de las hojas de la *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por SD

El cromatograma CG-MS del AE de las Hojas obtenido por Arrastre con Vapor de Agua (SD), evidenció la presencia de 24 picos con tiempos de retención desde cero (0) hasta 33 minutos, correspondientes a sesquiterpenos, cetonas, ácidos, alcoholes, alcanos y alquenos, tal y como se evidencia en la tabla 11.

Tabla 11 Composición química del AE de las Hojas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por el método de Arrastre con Vapor de Agua.

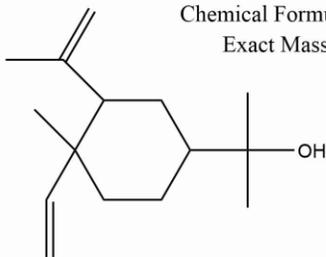
Pico	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	Base m/z	Área%	I Kovats
1	2,52	1,2-dicloroetano	62	5,51	727
*2	2,773	Ciclohexano	67	9,38	726
3	15,894	1-Nonanol	41	4,92	1174
*4	19,266	2-Dodecanona	58	8,01	1295
5	19,967	3,3-dimetil-1-Penteno	69	1,75	1320
6	21,482	1-Octanol	55	1,21	1376
7	24,504	2-metilpentanal	58	1,15	1494

8	25,893	7-octen-2-ol, 2-metil-6-metileno-	59	4,54	1552
9	26,114	1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-, (E)- (Estereoisómero)	69	5,44	1561
10	26,613	1H-Cicloprop[e]azulen-7-ol, decahidro- 1,1,7-trimetil-4-metileno-	43	6,78	1582
*11	26,723	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11- trimetill-, [S-(Z)]-	41	8,02	1587
12	26,858	2-Acetylbenzoic acid	149	0,98	1592
13	27,17	Propanedinitrilo (etoxi)	66	2,48	1606
14	27,367	7-metil-3,4-Octadieno	67	0,87	1615
15	27,448	Propanedinitrile, (ethoxy)	66	1,19	1618
16	27,796	1,3,6,10-Dodecatetraeno	43	1,52	1634
17	27,923	2-Furanmetanol, tetrahídoro	105	3,99	1639
18	28,067	2-furanmetanol, tetrahídoro- α , α ,5- trimetil-5-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-, [2S-[2 α ,5 β (R*)]]-	59	0,81	1646
19	28,272	2-furanmetanol, tetrahídoro- α , α ,5- trimetil-5-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)-, [2S-[2 α ,5 β (R*)]]-	59	1,36	1655
*20	28,406	Ciclohexanometanol, 4-etenil- α , α ,4- trimetil-3-(1-metiletetil)-, [1R- (1 α ,3 α ,4 β)]-	59	17,58	1661
21	28,745	7-Octen-2-ol, 2-metil-6-	59	1,1	1676
22	29,406	2-Furanmethanol, tetrahídoro	43	1,53	1706
23	30,996	7-Octen-2-ol, 2-metil-6-	43	0,78	1780
24	31,626	1-Decen-3-ine	65	2,08	1810
25	44,386	Ftalato de di- <i>n</i> -octilo	57	7,02	2530
				100	

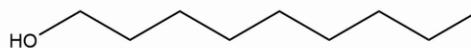
El aceite esencial de las hojas de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por arrastre con vapor de agua (SD), demostró la presencia de varios compuestos de interés (*), estando en mayor presencia el 2-Decanona (8,01%), 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetill-, [S-(Z)]- (8,02%), Ciclohexano (9,38%) y el Ciclohexanometanol 4-etenil- α , α ,4-trimetil-3-(1-metiletetil)-, [1R-(1 α ,3 α ,4 β)]- (17,58%). Sin embargo, cabe destacar la presencia de varios compuestos de naturaleza terpénica, siendo el caso del (+)- Espatulénol (1H-Cicloprop[e]azulen-7-ol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-); 10-epi-Elemol (Ciclohexanometanol, 4-etenil- α , α ,4-trimetil-3-(1-metiletetil)-, [1R-(1 α ,3 α ,4 β)]-), Nerolidol (1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-, (E)-), Acetofenona (Ácido 2-acetilbenzoico) y el Mircenol (7-octen-2-ol, 2-metil-6-metileno), tal y como se evidencia en la ilustración N° 67.

Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl-a.,a.,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)
 Ciclohexanometanol, 4-etenil-a,a,4-trimetil-3-(1-metiletenil)-, [1R-(1a,3a,4b)]-

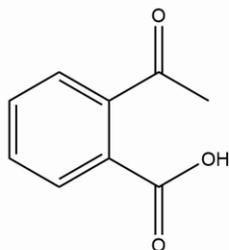
Chemical Formula: $C_{15}H_{26}O$
 Exact Mass: 222,20



1-Nonanol
 Chemical Formula: $C_9H_{20}O$
 Exact Mass: 144,15

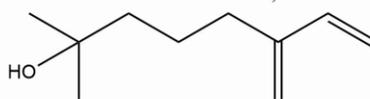


2-Acetylbenzoic acid
 Ácido 2-acetilbenzoico
 Chemical Formula: $C_9H_8O_3$
 Exact Mass: 164,05



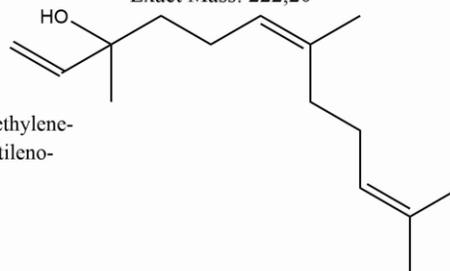
7-Octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene
 7-octen-2-ol, 2-metil-6-metileno
 Mircenol

Chemical Formula: $C_{10}H_{18}O$
 Exact Mass: 154,14



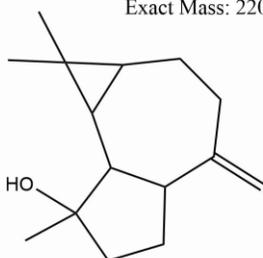
1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, (E)-
 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-, (E)-
 Norenidol

Chemical Formula: $C_{15}H_{26}O$
 Exact Mass: 222,20



1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylenc-
 1H-Cicloprop[e]azulen-7-ol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-
 (+)-Spatulenol

Chemical Formula: $C_{15}H_{24}O$
 Exact Mass: 220,18



1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, [S-(Z)]-
 1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimetil-
 Nerolidol

Chemical Formula: $C_{15}H_{26}O$
 Exact Mass: 222,20

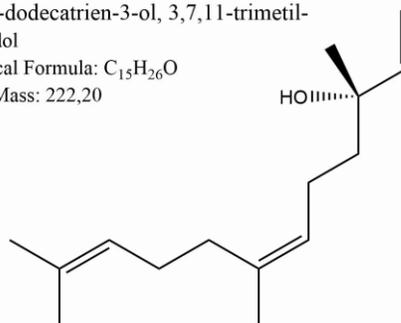


Ilustración N° 67 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de las hojas de *Siparuna gesnerioides* por SD

El espectro de masas acoplado al cromatógrafo de gases arrojó como resultado para este aceite esencial, los diversos picos y espectros requeridos para la identificación de los compuestos presentes, así como sus diversos fragmentos, tal como es el caso de las siguientes sustancias.

6.3.3.1. (+)-Espatuleno

El (+)-Espatuleno ($C_{15}H_{24}O$) es un producto natural reportado en diversas especies vegetales, clasificado como un sesquiterpenoide carbocíclico con un alcohol terciario y un grupo olefínico. Este compuesto tiene como nombre IUPAC: 4-metilidenodecahidro-1H-ciclopropa[e]azuleno el cual lleva tres sustituyentes metilo en las posiciones 1,1 y 7, así como un sustituyente hidroxilo en la posición 7. Esta molécula presenta diversas características como componente de aceite volátil, un metabolito vegetal, un anestésico y un agente vasodilatador CNIB (2022).

El espatuleno además ha demostrado actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antiproliferativas y antimicobacterianas; además ha mostrado una alta actividad antioxidante con un CL_{50} de 85,60 $\mu\text{g/mL}$ en el sistema DPPH, Nascimento, et.al. (2018).

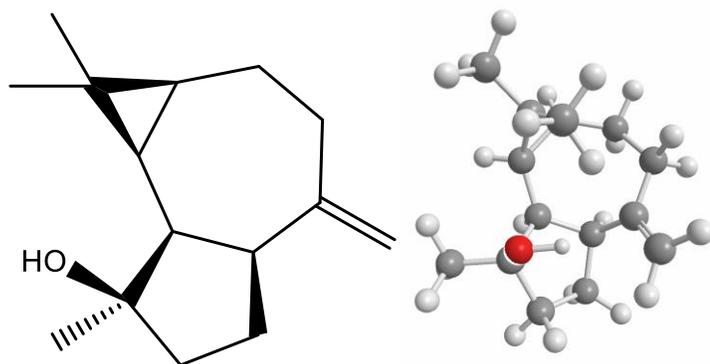


Ilustración N° 68 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de (+) -Espatuleno por medio de ChemDraw

El (+)-Espatulenol ha sido aislado e identificado en las partes aereas de *Siparuna guianensis* Aublet (*negramina*) con un porcentaje de area relativo entre el 15,7% y el 22%, al igual que en *Siparuna muricata* aunque en menor proporción Villalta (2013).

Los resultados reportados en la literatura concuerdan con los obtenidos en esta investigación que permiten corroborar la identidad química del espatulenol, como la masa molecular: 220,18, tiempo de Retención: 26,6, base m/z : 42.95 y un índice de retención de kovats de 1582 tal como se observa en el espectro de masas experimental (ilustración N° 69) y teórico-(ilustración N° 70).

Peak#:10 R.Time:26.613(Scan#:7235)
 MassPeaks:54
 RawMode:Averaged 26.607-26.620(7233-7237)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

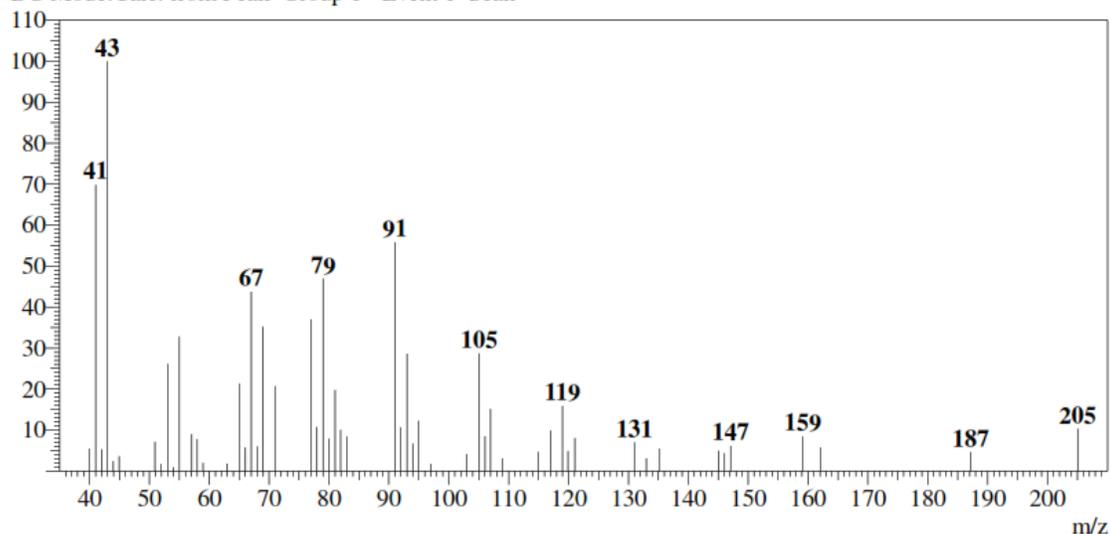


Ilustración N° 69 Espectro de masas experimental para el (+)-Espatulenol presente en el AE de *S. gesnerioides*.

Hit#:1 Entry:20009 Library:NIST11s.lib
 SI:82 Formula:C15H24O CAS:6750-60-3 MolWeight:220 RetIndex:1536
 CompName:1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1a.alpha.,4a

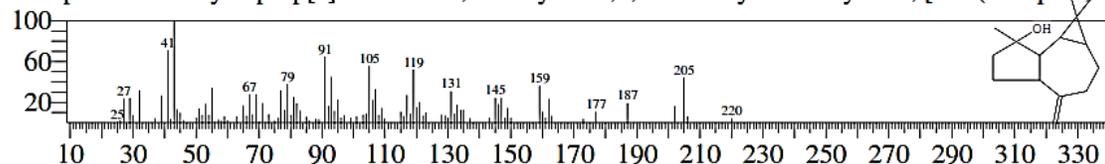


Ilustración N° 70 Espectro de Masas teórico para el Espatulenol. Tomado de NITS (2014)

El índice de retención de kovats arrojado por el espectro de masas con valor de 1582 presenta similitud a lo reportado en la biblioteca NIST11s.lib con un valor de 1536, tal como se puede evidenciar en el espectro de masas teórico para el Espotulenol (ilustración N° 70), de igual forma, en la base de datos del libro web de química del Nits, SRD 69 se puede evidenciar que el valor del índice de retención varía según las condiciones en las cuales se calcule este valor, entre las más comunes se encuentra el tipo de columna y la polaridad de la fase estacionaria.

A continuación, en la ilustración No. 71 se presenta la fragmentación molecular del Espotulenol.

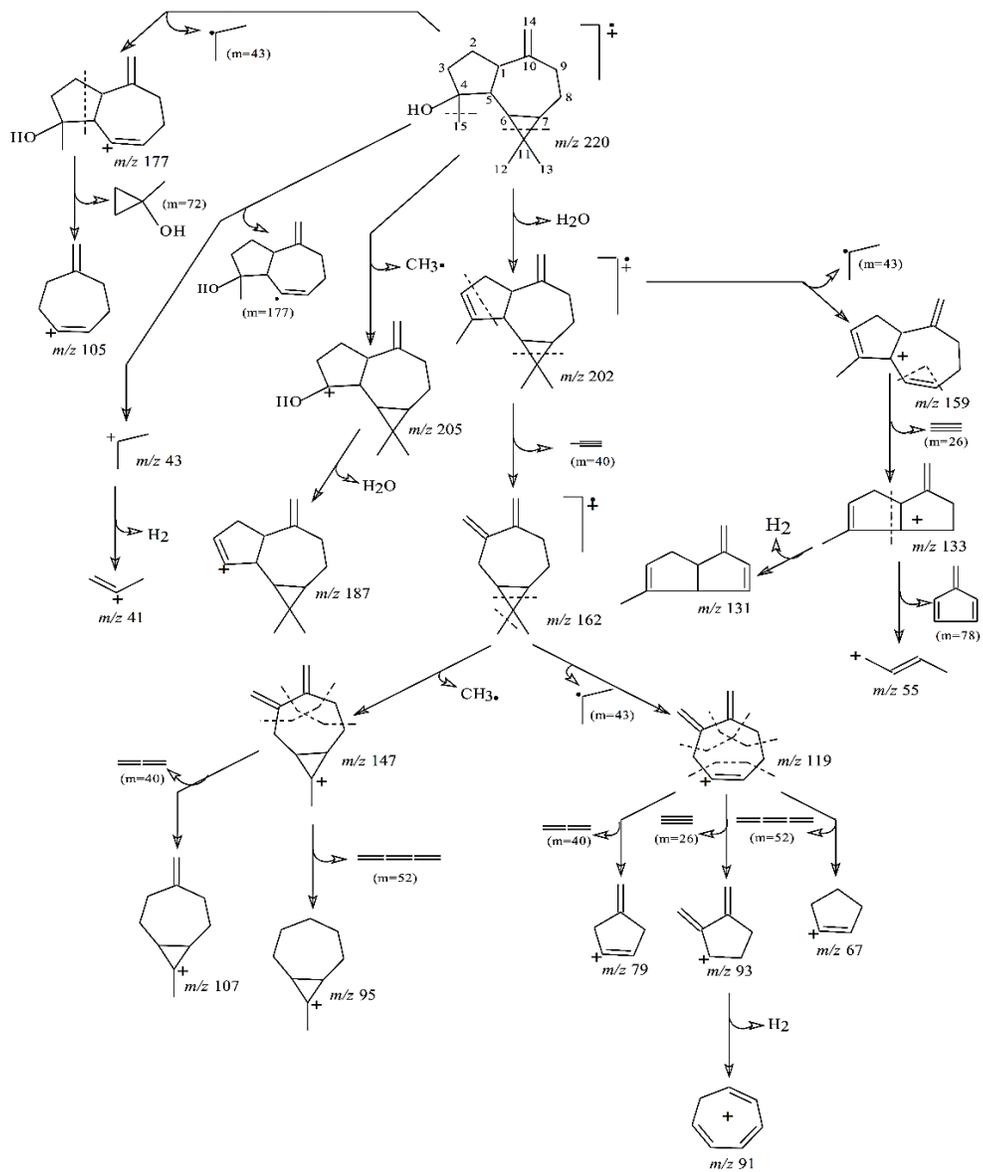


Ilustración N° 71 Propuesta de fragmentación para la molécula de Epatulenol. Tomado de Abati (2007).

6.3.3.2. 10-epi-elemol

El 10-epi-elemol es un compuesto de naturaleza terpenoide con un alcohol terciario y un grupo olefínico; es un producto natural reportado en los aceites esenciales

de diversas especies vegetales, como es el caso del *Citrus nobilis* y *Citrus reticulata*, tiene un papel como fragancia y metabolito vegetal, CNIB (2022).

Villalta (2013), enuncia la presencia del elemol con una tasa de 10% siendo uno de los compuestos principales de los aceites esenciales de las partes aéreas de la *S. guianensis Aublet (negramina)*, además, ha sido reportado en altas concentraciones como es el caso del aceite esencial de la madera del *Bulnesia sarmientoi Lorenz ex Griseb* con un porcentaje de área relativo del 10,17%, Enríquez y Orrabalis (2019).

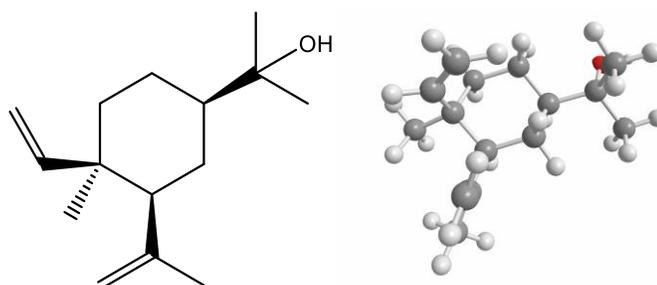


Ilustración N° 72 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de 10-epi-elemol obtenidos por medio de ChemDraw

Tal como se logra apreciar en los dos cromatogramas, tanto experimental (ilustración N° 72) como teórico (ilustración N° 73), la similitud entre los picos fragmento, permite confirmar la presencia de 10-epi-elemol en el aceite esencial.

Peak#:20 R.Time:28.406(Scan#:7772)
MassPeaks:64
RawMode:Averaged 28.400-28.413(7771-7775)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

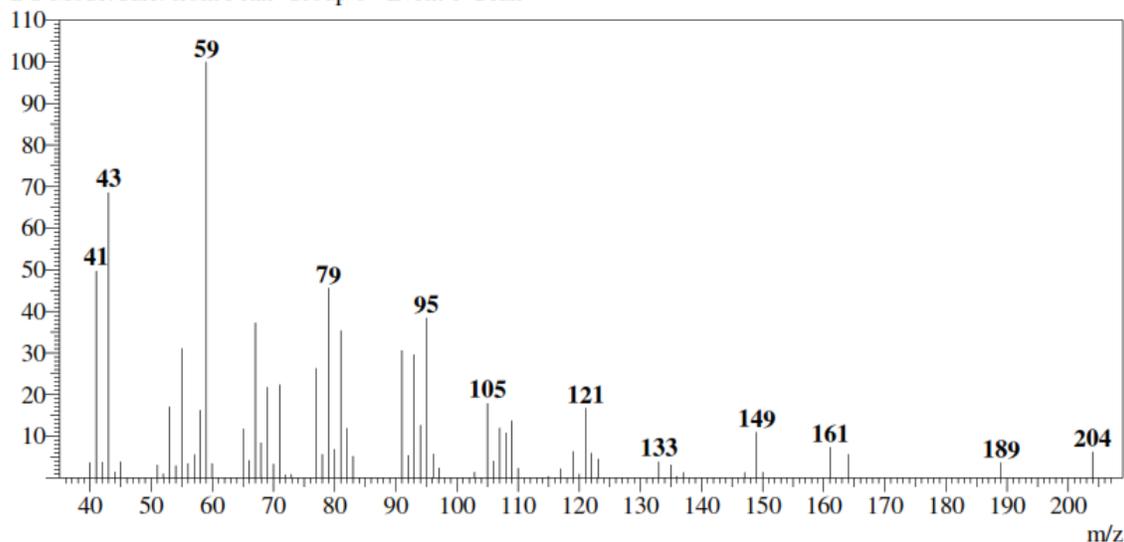


Ilustración N° 73 Espectro de masas experimental para el 10-epi-elemol presente en el AE de *S. gesnerioides*.

Line#:20 R.Time:28.403(Scan#:7772) Retention Index:1661 MassPeaks:64
RawMode:Averaged 28.400-28.413(7771-7775) BasePeak:59.00(153040)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1 Scan

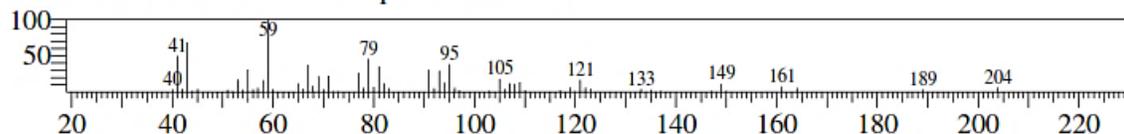


Ilustración N° 74 Espectro teórico del 10-Epi-elemol contenido en la biblioteca NIST11s.lib del equipo de espectrometría de masas.

En los espectros de masas teórico (ilustración N° 74) y experimental (ilustración N° 73) muestran similitud para el pico de ion molecular con un valor m/z de 204 y los picos fragmento con un valor m/z de 189, 161, 149, 133, 121, 105, 95, 79 y 59, los respectivos índices de Kovats reportados y recopilados por la Nits, (2021) los valores oscilan entre 1527 y 2079, las condiciones exógenas como son el equipo implementado, la fase estacionaria, tipo de columna, polaridad de la columna, etc... permite asignar el valor obtenido de 1639 para el índice de kovats experimental.

6.3.3.3. Nerolidol

El nerolidol ($C_{15}H_{26}O$) es un sesquiterpénoide farnesano que lleva grupos metilo en las posiciones 3, 7 y 11 y un grupo hidroxilo en la posición 3; componente principal de aceites volátiles; siendo este producto de carácter natural presente en estructuras florales de las especies vegetales; es ampliamente usado como agente saborizante de alimentos, cosmético y no cosmético, feromona, neuroprotector, antifúngico, antiinflamatorio, antihipertensivo, antioxidante, atrayente de insectos y herbicida. Es un compuesto orgánico volátil que posee dos isómeros geométricos, *trans* y *cis* CNIB (2022) los cuales ambos fueron identificados por el espectro masas, sus estructuras químicas se pueden apreciar mejor en la parte inferior izquierda de la ilustración N° 67.

El Nerolidol fue reportado como compuesto principal de los aceites esenciales de *Siparunas* recolectadas en el estado de Rondônia (Brasil) en el mes de junio durante el tiempo de floración, sin embargo, su presencia fue nula en el mes de febrero, lo que demuestra que la producción de compuestos de las especies pueden estar o no presentes según cambios que pueda sufrir la especie, Villalta (2013), de igual forma se encuentra presente en los aceites esenciales de las hojas de la *Siparuna teocafora* colectada en Panamá Kumari *et al.* (2014).

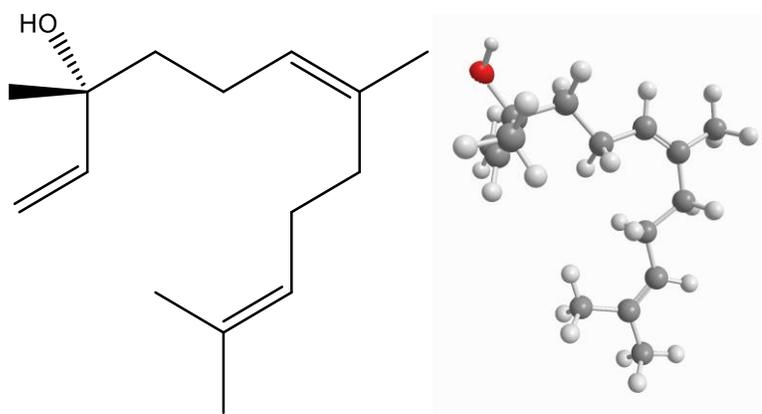


Ilustración N° 75 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula de Nerolidol obtenidos por medio de ChemDraw

El espectro de masas experimental (ilustración N° 75) y el teórico (ilustración N° 76) del Nerolidol muestran similitudes para el pico de ion molecular con un valor m/z de 121 y los picos fragmento de m/z 107, 91, 79, 69, 43 y 41.

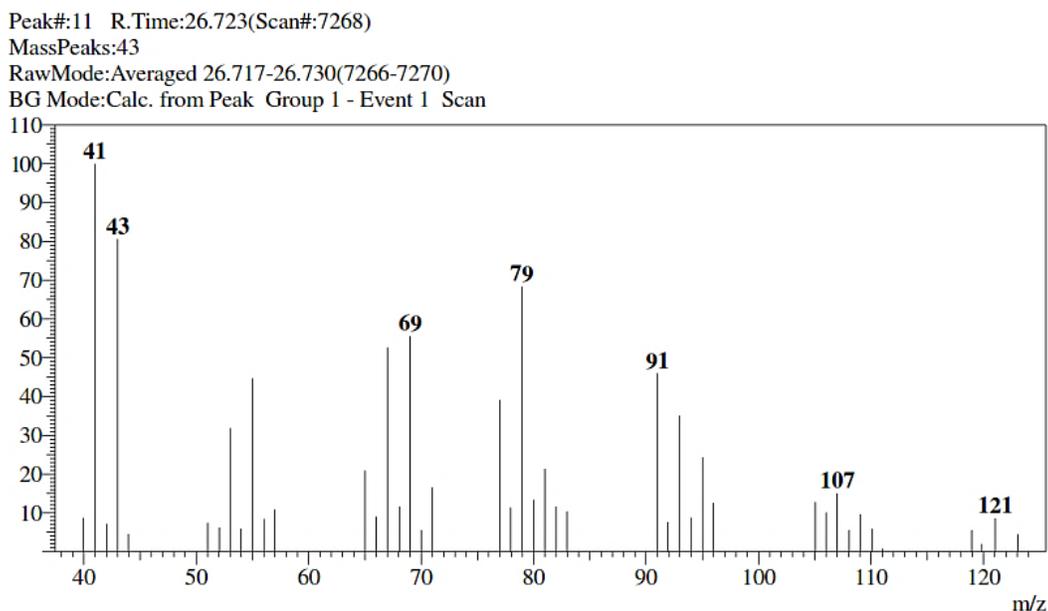


Ilustración N° 76 Espectro de masas experimental para el Norelidol (Z) presente en el AE de *S. gesnerioides*.

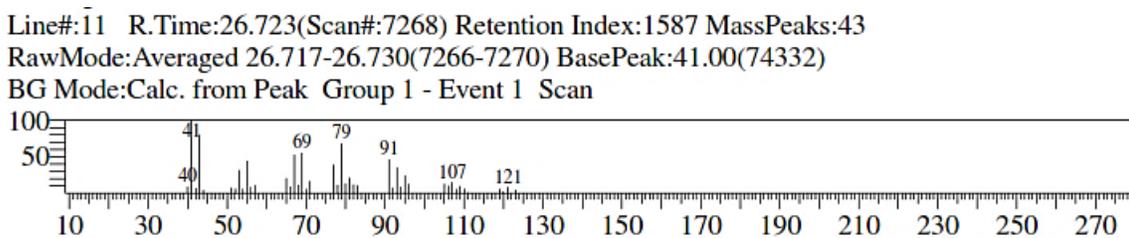


Ilustración N° 77 Espectro teórico del Norelidol (Z) contenido en la biblioteca NIST11s.lib del equipo de espectrometría de masas.

Los respectivos índices de Kovats experimentales obtenidos presentan un valor de 1561 siendo estos muy similares a lo reportado por Guerrero, (2008) y Choi, (2005) con valores correspondientes a 1564 y 1565, cabe resaltar que estos valores pueden variar un poco debido a la técnica y a las condiciones empleadas.

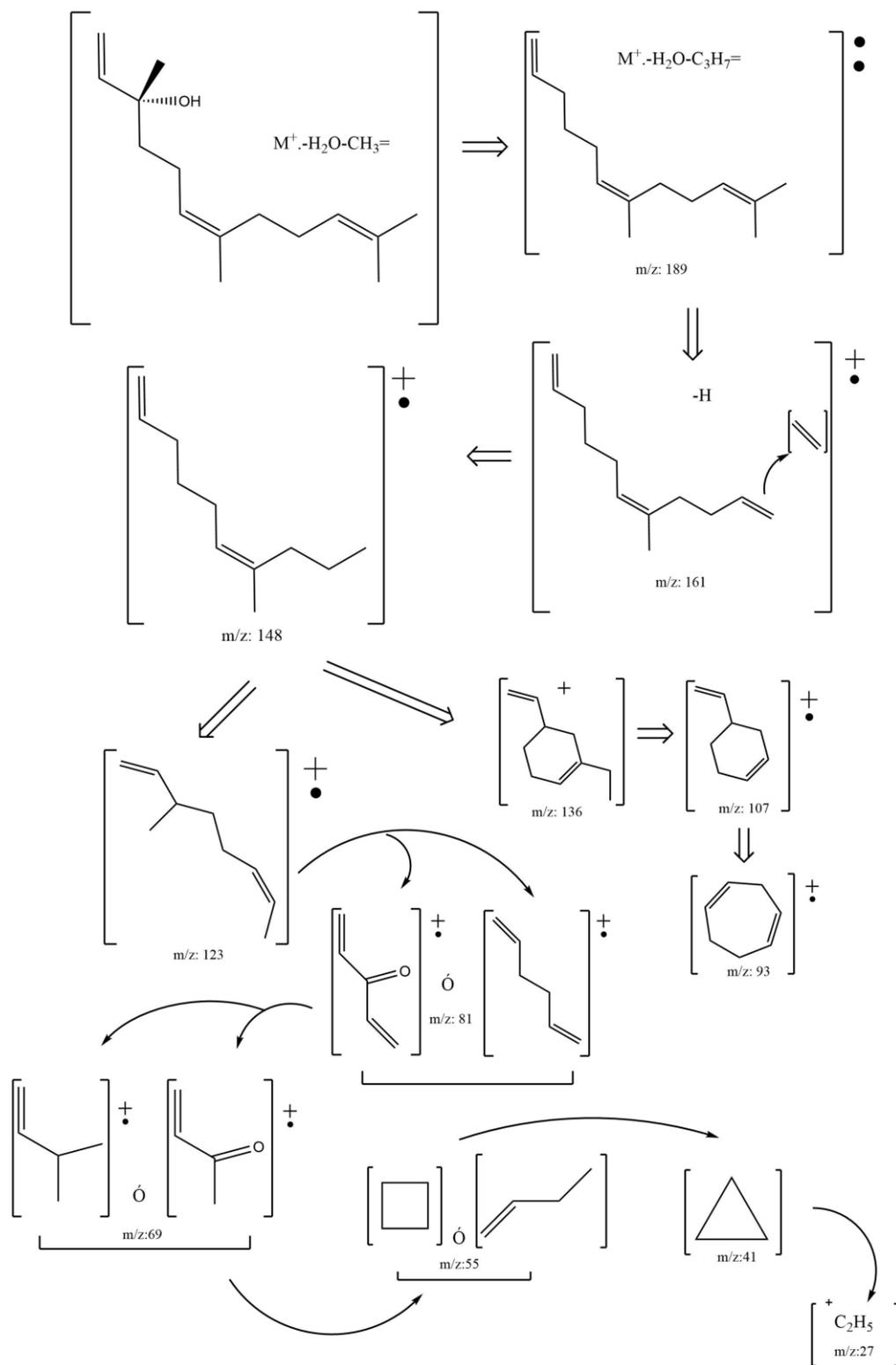


Ilustración N° 78 Propuesta de fragmentación para el E-Nerolidol. Modificada de Guerrero, (2008).

Guerrero, (2008) se basa en los siguientes fundamentos para la postulación de la fragmentación molecular del E-Nerolidol o *trans*-Nerolidol:

“-Tal como indica la literatura, el Trans-Nerolidol, alcohol terciario, no presenta el pico $M - H_2O$, como muestran algunos alcoholes terciarios (Silverstein, 1998), pero mediante un reordenamiento es posible eliminar una molécula de agua acompañada de un metilo (CH_3) ó propilo (C_3H_7).

-El pico base m/e 69 puede ser debido al fragmento C_5H_9 ó C_3H_5CO .

-Ausencia del fragmento $M^+ - H_2O$.

-Presencia de los iones C_3H_3 (m/e 41) y C_7H_9 (m/e 93) con intensidad mayor al 50%.”

6.3.3.4. Mircenol

El mircenol ($C_{10}H_{18}O$) es un monoterpénoide y un alcohol terciario que es oct-7-en-2-ol sustituido por un grupo metilo en la posición 2 y un grupo metilideno en la posición 6. Hasta el momento no se han encontrado artículos o textos científicos en los cuales se haya reportado el mircenol como componente del aceite esencial del género *Siparuna*, sin embargo, ha sido reportado en diversos aceites esenciales de especies de pino como un compuesto mayoritario Iñiguez et al. (2014), *Eucalyptus tereticornis* en una baja concentración Arango et.al. (2011), y además en *Elsholtzia pilosa* y *Ocimum gratissimum*, presenta un papel importante como metabolito vegetal y fragancia, CNIB (2022).

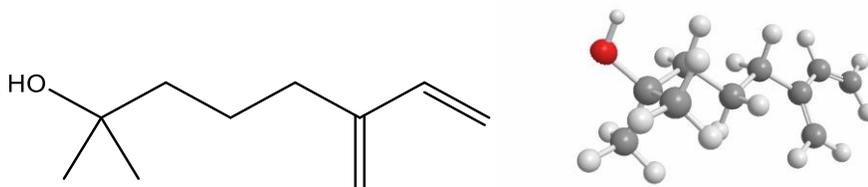


Ilustración N° 79 Formula Química Estructural lineal y en 3D de la molécula del Mircenol obtenidos por medio de ChemDraw

El Mircenol mostró un pico de ion molecular m/z , de 154 uma, valor comparado con los arrojados por el espectro teórico de la librería NIST, logrando identificar

similitud entre los siguientes picos con valores m/z de 41, 43, 59, 79, 93, 107, 121, 136 que se encuentran presentes tanto en el espectro experimental (ilustración N° 78) como en el espectro teórico (ilustración N° 79); por otro lado, se presenta una diferencia entre los valores del índice de retención de kovats teórico (1552) y el experimental suministrado por la biblioteca NIST11s.lib del espectro de masas y Ruíz, (2017) con un valor de 1064 y 1075, respectivamente, este margen de error puede ser atribuido a la diferencia de técnicas implementadas así como las condiciones bajo las cuales se calculó este valor, cabe resaltar que el valor puede variar debido a variables independientes que se aplican durante el proceso de inyección de la muestra al cromatógrafo de gases como lo son el tipo de columna implementada, polaridad de la fase, temperatura a la cual es llevada la muestra entre otras, tal como lo demuestra NITS, (2021) en su base de datos la cual cuenta con varios datos relacionados con el índice de kovats según las diversas variables que se han implementado para la identificación de la molécula y el cálculo del índice de kovats.

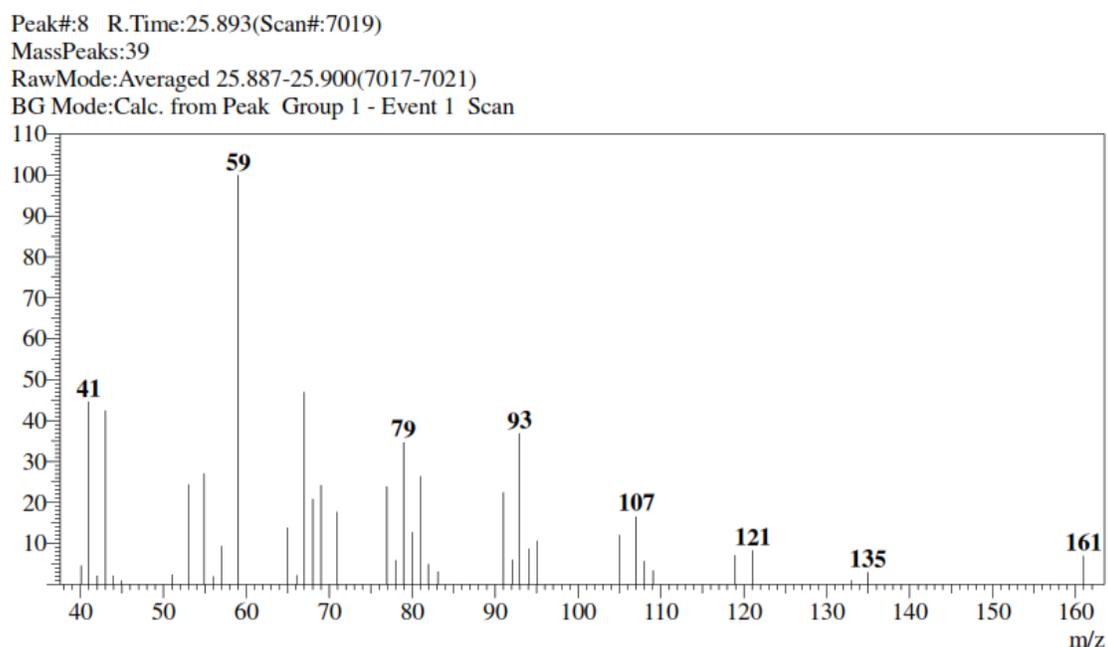


Ilustración N° 80 Espectro de masas experimental para el Mircenol presente en el AE de *S. gesnerioides*.

Hit#:1 Entry:9956 Library:NIST11s.lib
SI:85 Formula:C10H18O CAS:543-39-5 MolWeight:154 RetIndex:1064
CompName:7-Octen-2-ol, 2-methyl-6-methylene- \$\$ Myrcenol \$\$ 2-Methyl-6-methylene-7-octen-2-ol

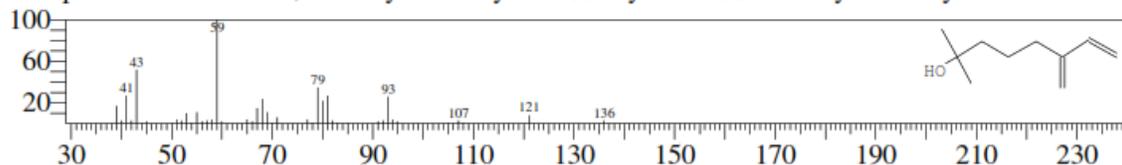


Ilustración N° 81 Espectro teórico del Mircenol contenido en la biblioteca NIST11s.lib del equipo de espectrometría de masas.

6.3.4. Cromatograma de gases CG-MS del AE de los Tallos secos de *S.*

gesnerioides (Kunth) por Arrastre con Vapor de Agua (SD).

El cromatograma CG-MS (Ilustración N° 80) corresponde al AE de los tallos obtenido por medio del método de Arrastre con Vapor de Agua (SD), se logran evidenciar 5 picos con tiempos de retención desde cero (0) hasta 45 minutos; mediante la espectrometría de masas se identificó la composición química de cada uno de los compuestos presente en el AE, el cual está constituido principalmente por hidrocarburos alifáticos de tipo aldehído, alcanos y alquenos; tal y como se evidencia en la tabla 12.

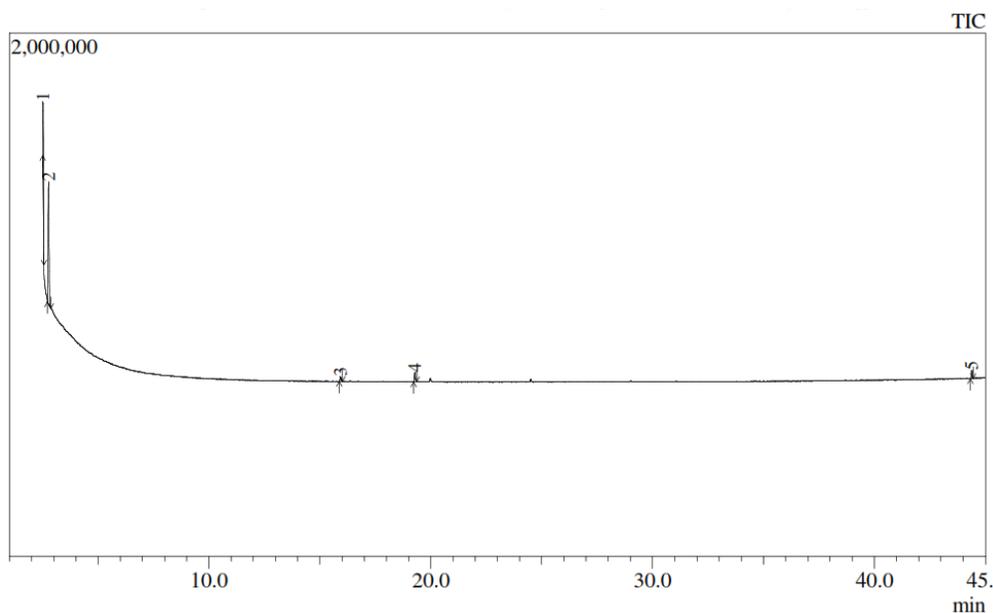
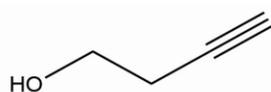


Ilustración N° 82 Cromatograma GC-MS del aceite esencial de las Ramas de la *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por SD

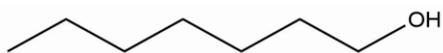
El aceite esencial de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por Arrastre con vapor de agua (SD), demostró la presencia de varios compuestos de interés, estando en mayor presencia el 1,2-dicloroetano (25,14%), Ciclohexeno (62,26 %) y 2-metilpentanal (5,42 %), tal como se muestra en la tabla 12 y en la ilustración N° 81 - 82.

Tabla 12 Composición química del AE de Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por el método de Arrastre con Vapor de Agua.

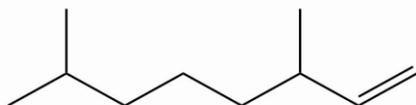
Pico	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	Base m/z	Área%	I Kovats
1	2,52	1,2-dicloroetano	62	25,14	727
2	2,771	Ciclohexeno	67	62,26	736
3	15,93	3,7-dimetil-1-Octeno	41	2,97	1176
4	19,285	2-metilpentanal	58	5,46	1296
5	44,389	3,3,4-trimetilhexano	57	4,17	2530
				100	



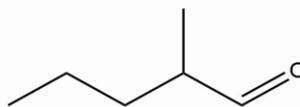
3-Butyn-1-ol
2-hidroxietilacetileno
Chemical Formula: C_4H_6O
Exact Mass: 70,04



1-Heptanol
Heptyl alcohol
Chemical Formula: $C_7H_{16}O$
Exact Mass: 116,12



1-Octene, 3,7-dimethyl-
1-octeno, 3,7-dimetil-
Chemical Formula: $C_{10}H_{20}$
Exact Mass: 140,16



Pentanal, 2-methyl-
Valeraldehído
Chemical Formula: $C_6H_{12}O$
Exact Mass: 100,09

Ilustración N° 83 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los tallos de *Siparuna gesnerioides* por SD

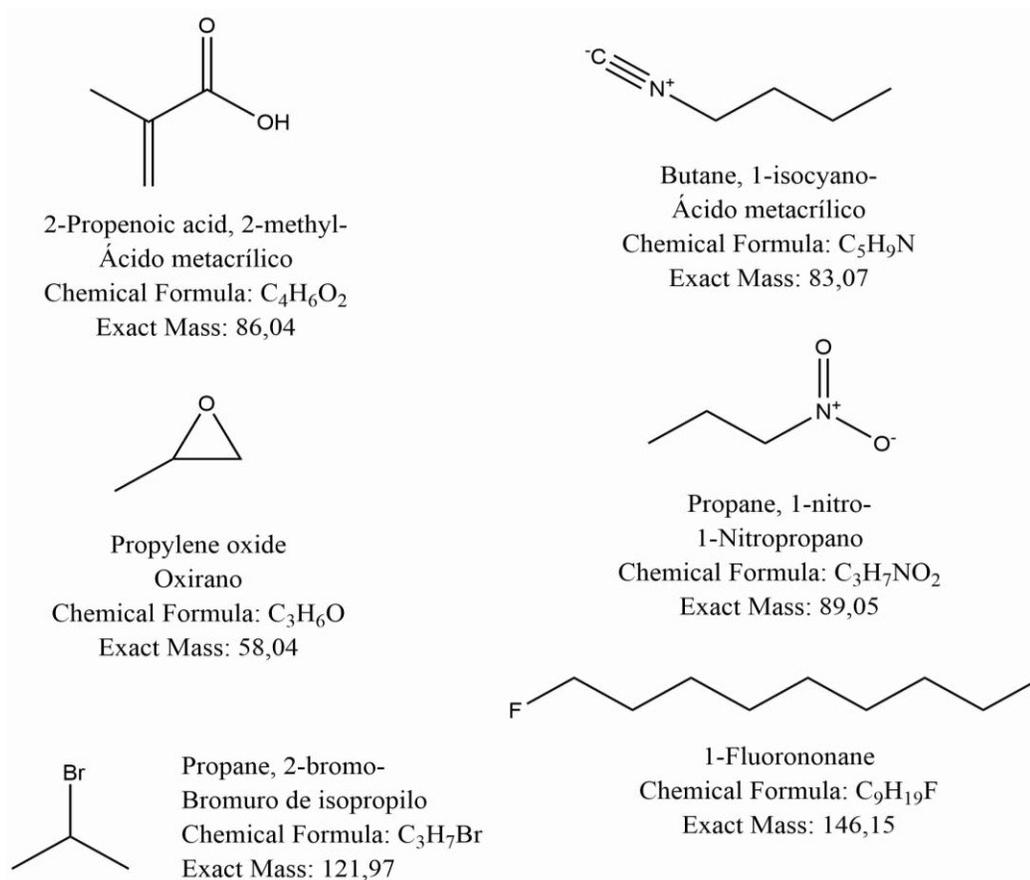


Ilustración N° 84 Estructura molecular de los compuestos identificados por CG-MS de los tallos de *Siparuna gesnerioides* por SD

6.3.5. Cromatograma de gases GC-MS del AE de los tallos secos de *S. gesnerioides* (Kunth) por Hidrodestilación asistida por Microondas (MWHD).

El cromatograma CG-MS de la Ilustración N° 83 corresponde al AE de los tallos obtenido por medio del método de Arrastre con Vapor de Agua (SD), donde se logra evidenciar 4 picos con tiempos de retención desde cero (0) hasta 15 minutos; mediante la espectrometría de masas se identificó la composición química de cada uno de los compuestos presentes en este AE, el cual está constituido de hidrocarburos alifáticos, alcoholes, alcanos y alquenos; tal y como se evidencia en la tabla 13.

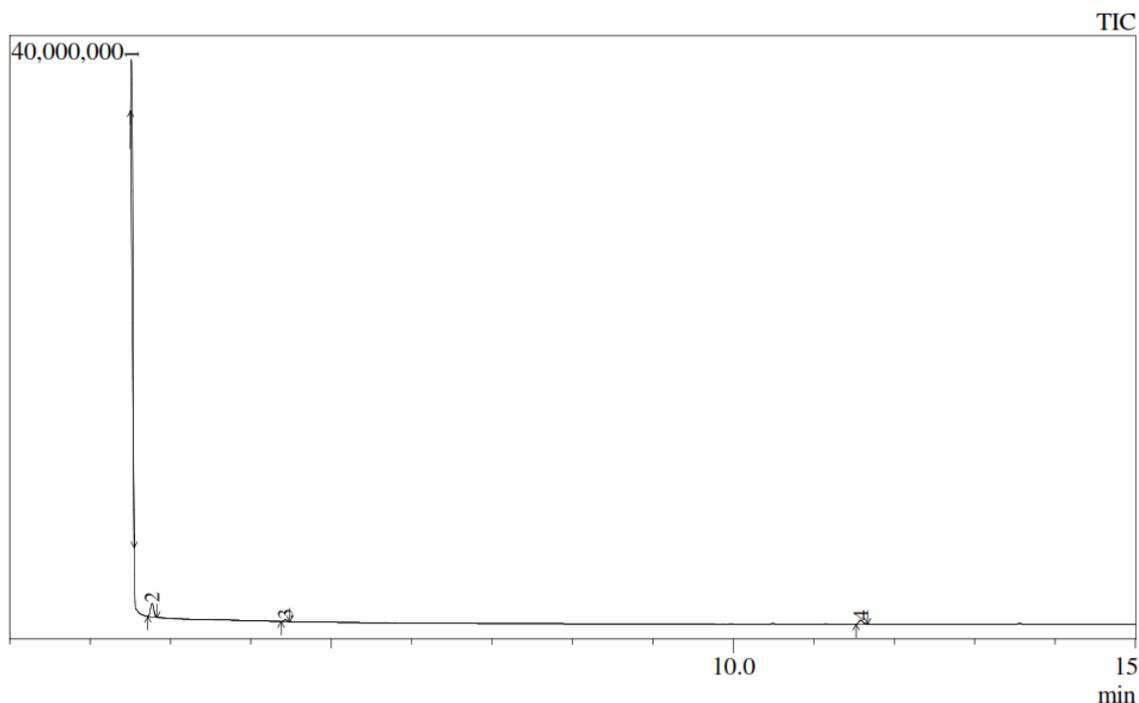


Ilustración N° 85 Cromatograma CG-MS del AE de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por MWHD

El aceite esencial de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por Hidrodestilación asistida por Microondas (MWHD), demostró la presencia de muy pocos compuestos, los cuales son principalmente de carácter clorados, tal como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13 Composición química del AE de los Tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) por el método de Hidrodestilación asistida por Microondas

Pico	Tiempo de Retención	Nombre del Compuesto	Base m/z	Área%	I Kovats
1	2,52	1,2-dicloroetano	64	81,79	727
2	2,771	Ciclohexeno	67	12,37	736
3	19,285	Etano, 1,1,2-tricloro-	61	1,65	791
4	44,389	2-clorociclohexanol	57	4,19	1030
				100	

Dentro de las características para la actividad antimicrobiana el componente activo es el encargado de realizar la acción bactericida, antiséptica o inhibitoria del

desinfectante, puede ser de naturaleza orgánica, fenólica u aceites esenciales, inorgánicos o compuestos clorados, Castellanos *et al.* (2019).

La baja presencia de compuestos en los aceites esenciales en comparación con los obtenidos por otros métodos de destilación pueden ser atribuidos a las altas temperaturas a la que fue expuesta la muestra, dado que el potencial del equipo se manejó en un rango de 70 – 90%, sin que se pudiera disminuir o aumentar por problemas con el microprocesador, dentro de las características claves para la unidad de extracción de aceites mediante la radiación por microondas se encuentra la potencia variable, es decir que el equipo debe presentar las condiciones óptimas de trabajo a diferentes frecuencias de tiempo y de potencia; cada equipo posee un controlador que incluye generalmente un microprocesador, aunque algunas unidades muy baratas las cuales no cuentan con la calidad requerida para el tiempo de trabajo al cual es sometido el equipo, el controlador es el encargado de manejar el reloj digital y temporizador de cocción; además, establece los niveles de potencia de microondas a la cual se va a trabajar y en algunos hornos de alta calidad, vigila sensores de humedad y de temperatura.

Como se mencionó en el apartado de metodología, el proceso de obtención del hidrolato mediante el método de MWA se realizó por secciones de 7 min de funcionamiento y 5 min de enfriamiento del equipo, según lo reportado con anterioridad por otros trabajos autores, sin embargo, en la mayoría de los hornos microondas el nivel de potencia es controlado por el ancho de pulso del generador que posee cada microondas el cual es generalmente un ciclo que dura 10 -30 segundos; mediante tres formas de funcionamiento ALTO permanece activado, MEDIO siendo de 10 segundos activado y 10 segundos apagado y finalmente LOW el cual puede ser 5 segundos activado y 15 segundos apagado Contreras (2010).

6.4. Ensayos Biológicos

Una vez pasadas las 24 horas para el óptimo proceso de incubación de la Cepa bacteriana de *Salmonella enteritidis*; se determinaron los resultados obtenidos para las

pruebas de sensibilidad o resistencia antimicrobiana de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) con respecto al patógeno *Salmonella enteritidis* en diferentes medios de cultivos.

6.4.1. Agar TSA

En primer lugar, se realizó la observación de los resultados obtenidos en el agar estándar (Agar TSA) dictaminado para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.

Tabla 14 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar TSA.

[] AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000ppm	0	0	0	0	0
10000ppm	0	0	0	0	0
50000ppm	0	0	0	0	0
AE PURO	0.8462	2.2038	1,1433	2,1901	1,4799
C.P Ampicilina	0.7677	0.1777	0,4727	0,17397	0,4171
C. N Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0

Como se logra apreciar en la tabla 14, los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en medio de cultivo Agar TSA, a concentraciones de 5000 ppm, 10000 ppm y 50000 ppm no presentaron halos de inhibición en ninguna de las dos placas realizadas; por lo cual, se puede considerar que a estas concentraciones el AE no presentó actividad antimicrobiana contra la *Salmonella enteritidis*, sin embargo, se puede observar en los datos de la tabla 14 y en la ilustración N° 86 que el aceite esencial en su forma intacta si presenta actividad antimicrobiana, presentando halos de inhibición de diámetro considerable con medidas estimadas de 1,1433 mm ($\pm 1,4799$), determinando que el aceite esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) presentó mayor efectividad contra *Salmonella enteritidis* en comparación con el antibiótico comercial empleado como control positivo, el cual presentó halos de inhibición de 0,4727 mm ($\pm 0,4171$).

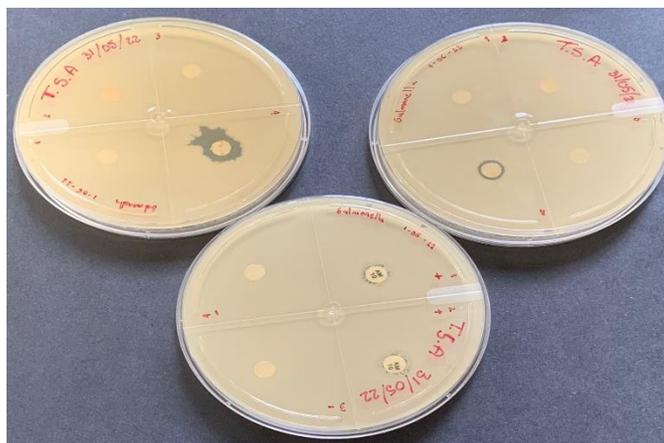


Ilustración N° 86 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar TSA para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

Según los resultados obtenidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el aceite esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) de hojas obtenido por SD, presenta moléculas tales como (+)-espatulenol y óxido de α -Bisabolol, que presentan actividad antimicrobiana al igual que la molécula de Óxido de propileno encontrada en el aceite esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) de Tallos, obtenida por el método HD; sin embargo, aunque los AE presentan compuestos que reportan actividad antimicrobiana según lo planteado por Rodríguez E. (2011), en muchos casos los antimicrobianos pueden no tener ningún efecto hasta que se rebasa una concentración crítica. El aceite esencial de Tallos por HD usado en forma pura en la prueba de sensibilidad antimicrobiana, fue el único cuadrante en presentar actividad, generando un halo mayor al control positivo (Ampicilina), por lo cual podemos determinar también que según lo reportado por Tafur *et al.* (2008) los mecanismos que utilizan las bacterias para defenderse de los antibióticos están en constante evolución, por lo cual al presentarse la evaluación entre un antibiótico comercial y una alternativa natural, se observó que las bacterias presentan mayor resistencia a los componentes antimicrobianos de la ampicilina, según Fierro *et al.* (2011) se reportó resistencia a ampicilina en el 81.25% de 16 cepas de *Salmonella* aisladas y esto debido a su alto uso frecuente para tratar infecciones bacterianas.

6.4.1.1. 6.4.2. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta con Manipulación Previa (DESPULPADORA ARCHILA)

6.4.2.1. Agar-Agar con extracto de Maracuyá (*Passiflora edulis*)

En la tabla 15 se encuentran los resultados obtenidos para los halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en Agar-Agar con extracto de Maracuyá (*Passiflora edulis*) contra la bacteria gramnegativa *Salmonella enteritidis* las medidas estimadas de 1,8134 mm ($\pm 0,4360$) para la concentración de 5000 ppm; 1,7149 mm ($\pm 0,34832$) para la concentración de 10000 ppm; 1,5278 mm ($\pm 0,81954$) para la concentración de 50000 ppm y de 2,3102 mm ($\pm 0,65803$) para la prueba de sensibilidad realizada con el aceite esencial intacto de los Tallos obtenido por el método de hidrodestilación simple, es importante resaltar que los resultados obtenidos con el AE puro tiene un diámetro mayor a la obtenida por el control positivo (Ampicilina) con un valor promedio de 1,9278 mm ($\pm 0,03564$).

De acuerdo con los resultados obtenidos a medida que aumenta la concentración de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) la bacteria *Salmonella enteritidis* va presentando un incremento en la resistencia antimicrobiana, debido a que la bacteria presenta mayor disminución de longitud de halo en la concentración de 50000 ppm en la primera replica y a 10000 ppm en la segunda replica, sin embargo, también se aprecia que el AE en estado puro presenta el mayor halo de inhibición según la ilustración N° 87.

Tabla 15 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Maracuyá (*Passiflora edulis*).

[] AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000ppm	1,5051	2,1217	1,8134	0,19009	0,4360
10000ppm	1,9612	1,4686	1,7149	0,12133	0,34832
50000ppm	0,9483	2,1073	1,5278	0,67164	0,81954
AE PURO	1,8449	2,7755	2,3102	0,43300	0,65803
Ampicilina	1,9026	1,953	1,9278	1,27E-03	0,03564

Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0
--------------------	---	---	---	---	---



Ilustración N° 87 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Maracuyá (*Passiflora edulis*) para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

Con base en los resultados obtenidos en el Agar-Agar con extracto de maracuyá (*Passiflora edulis*) y analizando los datos obtenidos en Agar TSA, se determinó que aunque ambos ensayos biológicos contaban con las mismas variables de concentración y de tipo de AE, en el Agar con extracto de pulpa de fruta se evidenció la presencia de halos de inhibición para los cuatro cuadrantes; teniendo como base al autor Rodríguez E. (2011) en donde enfatiza que se debe rebasar la concentración crítica para generar un efecto antimicrobiano, y que por más que los AE contengan moléculas que posean esta actividad se deben emplear concentraciones adecuadas para que se activen; si bien estos aceites esenciales tienen componentes como (+)-Espatulenol, Óxido de propileno y Oxido de α -Bisabolol, las concentraciones a 5000 ppm, 10000 ppm, y 50000 ppm aún son bajas para contrarrestar al patógeno, sin embargo, en combinación con los componentes que brinda el extracto de maracuyá (*Passiflora edulis*) al medio, se genera un incremento en el potencial antimicrobiano de estos AE; según Reyes & Sáenz, (2019) las especies del género *Passiflora* reportan en su composición mayoritariamente flavonoides y saponinas como compuestos con capacidades antimicrobianas y antiinflamatorias, que pueden estar aportando al proceso de contraposición del

crecimiento bacteriano ya que cabe aclarar que la mayoría de los agentes antimicrobianos usados en alimentos inhiben el crecimiento mas no lo eliminan.

6.4.2.2. Agar-Agar con extracto de Guanábana (*Annona muricata*)

Asimismo, como se puede observar en la tabla N° 16, los resultados obtenidos para los halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana con el Agar-Agar y el extracto de Guanábana contra el patógeno *Salmonella enteritidis* las medidas de los halos fueron de 1,6206 mm ($\pm 0,2078$) para la concentración de 5000ppm; 1,2336 mm ($\pm 0,2161$) para la concentración de 10000 ppm; 2,6019 mm ($\pm 0,6343$) para la concentración de 50000 ppm y de 6,6887 mm ($\pm 0,0679$) para la prueba de sensibilidad realizada con el aceite esencial puro de los tallos obtenido por el método de arrastre con vapor de agua, además, es importante resaltar que los resultados obtenidos con el AE puro tiene un diámetro mayor al obtenido por el control positivo (Ampicilina) cuyo valor promedio fue de 4,0038 mm ($\pm 0,1036$).

De acuerdo con los resultados mostrados en la ilustración N° 88, se determina que a medida que se aumenta la concentración de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth), la bacteria *Salmonella enteritidis* va presentando un incremento en la resistencia antimicrobiana, ya que al observar los resultados obtenidos entre las concentraciones de 5000 ppm a 50000 ppm la bacteria presenta una mayor disminución en el diámetro del halo a la concentración de 10000 ppm, sin embargo, también se puede apreciar que el AE en estado puro en comparación con las demás concentraciones presenta un gran halo de inhibición mostrando su alto potencial antimicrobiano.

Tabla 16 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Guanábana (*Annona muricata*).

[] de AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000 ppm	1,7675	1,4736	1,6206	0,0431	0,2078
10000 ppm	1,3864	1,0808	1,2336	0,0466	0,2161
50000 ppm	3,0504	2,1533	2,6019	0,4023	0,6343
AE PURO	6,7367	6,6407	6,6887	4,1E-03	0,0679
C.P. Ampicilina	3,9305	4,077	4,0038	0,0107	0,1036

C.N. Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0
-------------------------	---	---	---	---	---

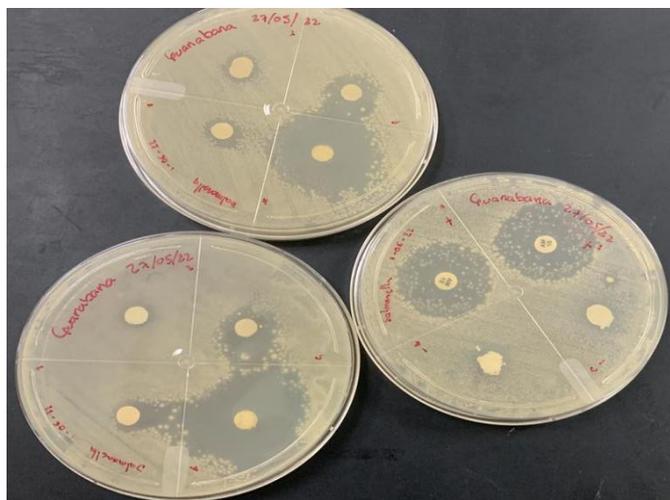


Ilustración N° 88 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Guanábana (*Annona muricata*) para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

Según los resultados obtenidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el aceite esencial de los tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por SD empleado en el cuadrante 4, presenta entre sus compuestos químicos la molécula de Dodecanona que registra actividad antimicrobiana, sin embargo, y teniendo como referentes los datos recolectados a partir de la investigación, el gran potencial antimicrobiano que se evidenció en el medio de cultivo con extracto de Guanábana (*Annona muricata*) también tiene que ver con las propiedades que aporta la misma; según Hernández (2013) se reporta que la pulpa de la guanábana está constituida principalmente por agua y proporciona sales minerales, potasio, fósforo, hierro, calcio, lípidos, además, de tener un alto valor calórico debido a la presencia de hidratos de carbono; además es rica en vitamina C y provitamina A, así como de vitamina B; que aportan mayor beneficio a los medios para un óptimo crecimiento del patógeno, de igual forma, según Pinero (2022) se reporta para las plantas pertenecientes a la familia de las Annonaceae su alto contenido de acetogeninas que se han estudiado por su alto poder antimicrobiano.

6.4.2.3. Agar-Agar con extracto de Fresa (*Fragaria vesca*)

En los resultados obtenidos de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en Agar-Agar con el extracto de Fresa contra la bacteria gramnegativa de *Salmonella enteritidis* se puede evidenciar que al igual que en el Agar TSA en concentraciones de 5000 ppm, 10000 ppm y 50000 ppm no se presenciaron halos de inhibición, en contraste con lo observado en el cuadrante número 4 correspondiente al AE puro, el cual presentó halos de 4,2001 mm ($\pm 5,939$) (ilustración N° 89), mayor a la obtenida para el halo de inhibición del antibiótico, sin embargo, también se logró apreciar que una de las réplicas realizadas presentó contaminación y crecimiento nulo de la cepa bacteriana, por lo cual no presentó resultados en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en consecuencia a estos parámetros se obtuvo como se puede apreciar en la tabla N° 17 una dispersión de datos muy grande ($\pm 5,939$).

Tabla 17 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Fresa (*Fragaria vesca*).

[] de AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000 ppm	0	0	0	0	0
10000 ppm	0	0	0	0	0
50000 ppm	0	0	0	0	0
AE PURO	8,4001	0	4,2001	35,271	5,939
C.P. Ampicilina	7,3168	7,0476	7,1822	0,03621	0,1903
C.N. Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0

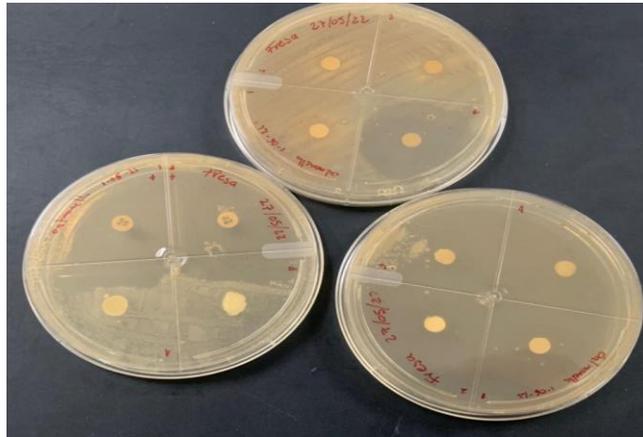


Ilustración N° 89 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Fresa (*Fragaria vesca*) para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

Según los resultados obtenidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el aceite esencial de los tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por SD empleado en el cuadrante 4, presenta entre sus compuestos químicos la molécula de Dodecanona la cual registra actividad antimicrobiana. El género de la *Fragaria* según Lucas (2017) reporta alto contenido de flavonoides a los que se les atribuye propiedades antimicrobianas, así como antocianinas a las que también se les atribuye actividad anti proliferativa, por lo cual, es de considerar que los resultados de inhibición serían más positivos contra el patógeno de *Salmonella enteritidis*, en muestras con contenido de (+)-Espatulanol, Óxido de propileno y α -Bisabolol, Dodecanona y flavonoides, sin embargo, aunque se presenten este tipo de compuestos con actividad antimicrobiana las concentraciones que se emplean también juegan un papel importante. Cabe aclarar que para la realización de los medios de cultivo el pH es un factor influyente en la solidificación del agar, ya que basados en la metodología empleada por Polo *et al.* (2019) si este presentaba una alta acidez, o una alta alcalinidad no ocurría la solidificación del medio, por lo que recomendaban medir el pH de la solución con la que se realizó el medio natural, puesto que algunos de los materiales utilizados pueden no tener una neutralidad en la concentración de hidrogeniones.

Por otra parte, en Lucas (2017) también se reporta que las antocianinas son inestables y son propensas a la degradación por varios factores como la luz, el oxígeno, el pH, la estructura química, concentraciones, solventes, actividad enzimática entre otros; por lo tanto, al momento de alterar el pH del medio, posiblemente fueron alterados las propiedades de los metabolitos secundarios presentes en la pulpa.

6.4.3. Medios de Cultivo a Base de Extracto de Fruta sin Manipulación Previa

6.4.3.1. Agar-Agar con extracto de Melón (*Cucumis melo*)

Se puede observar en la tabla 18, los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en Agar-Agar con el extracto de Melón contra *Salmonella enteritidis* en donde se puede apreciar halos con un valor promedio de 0,5308 mm ($\pm 0,1592$) para la concentración de 5000 ppm; 0,6661 mm ($\pm 0,0564$) para la concentración de 10000 ppm; 0,6147 mm ($\pm 0,3039$) para la concentración de 50000 ppm y 2,002 mm para la prueba de sensibilidad realizada con el aceite esencial intacto de las hojas obtenido por el método de hidrodestilación simple, además, cabe resaltar que los resultados obtenidos con el AE puro tienen un diámetro mayor a la obtenida por el antibiótico (Ampicilina) como control positivo 1,4923 mm ($\pm 0,0193$).

De acuerdo con los resultados obtenidos (ilustración N° 90) se puede evidenciar que a medida que se aumenta la concentración de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) se presenta mayor actividad antimicrobiana en contra del patógeno de estudio, asimismo, se puede observar que a diferencia del Agar TSA, en el Agar a base de extracto de melón, la bacteria presentó menor resistencia antimicrobiana a los AE obtenidos.

Tabla 18 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Melón (*Cucumis melo*).

[] AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000 ppm	0,6434	0,4182	0,5308	0,0253	0,1592
10000 ppm	0,6261	0,706	0,6661	3,2E-03	0,0564

50000 ppm	0,3998	0,8296	0,6147	0,0923	0,3039
AE PURO	2,002	-	-	-	-
Ampicilina	1,506	1,4786	1,4923	3,7E-04	0,0193
Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0

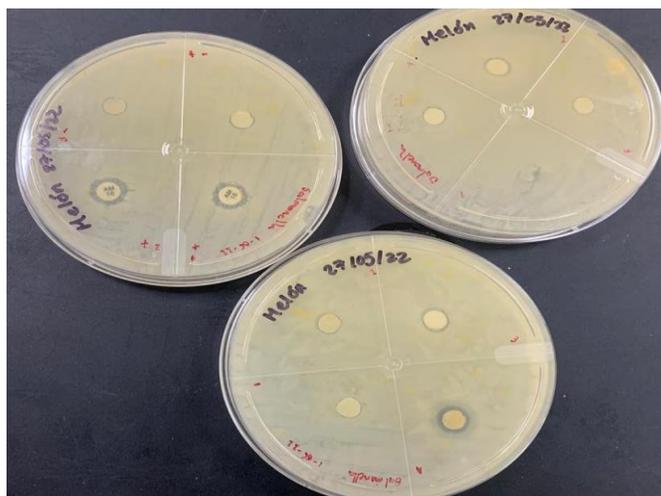


Ilustración N° 90 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Melón (*Cucumis melo*) para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

Según los resultados obtenidos en la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el (+)-Espatuleno, Oxido de α -Bisabolol y la Dodecanona se encuentran presentes en los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) y se les atribuye el potencial antimicrobiano de los mismos; se ha determinado también que el extracto de pulpa de fruta de cada uno de los diferentes medios afecta o aporta al potencial de inhibición de los aceites y el crecimiento de la Cepa bacteriana en los medios; por tal motivo según Trujillo (2001) en el análisis fisicoquímico y microbiológico realizado a la pulpa del melón (*Cucumis melo*) se determinó como una fruta de alta humedad ($aw = 0,985 \pm 0,04$, $n = 3$), y de baja acidez ($pH = 6,55 \pm 0,05$, $n = 3$), siendo un extracto óptimo para el proceso de solidificación del medio y su alto aporte nutricional, la caracterizan como un buen sustrato para el crecimiento microbiano.

6.4.3.2. Agar-Agar con extracto de Tomate (*Solanum lycopersicum*)

De igual forma, en la tabla N° 19 se pueden observar los resultados obtenidos para los halos de inhibición de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en Agar-Agar con el extracto de Tomate (*Solanum lycopersicum*) contra la bacteria gramnegativa de *Salmonella enteritidis* en donde se puede apreciar un diámetro promedio de 2,0559 mm ($\pm 0,8841$) para la concentración de 5000ppm; 1,0386 mm ($\pm 1,1109$) a 10000ppm; 2,9719 mm ($\pm 1,2574$) a 50000ppm y 3,3524 mm ($\pm 1,1082$) para la prueba de sensibilidad realizada con el aceite esencial puro de las hojas obtenido por el método de hidrodestilación simple, además, es importante resaltar que los resultados obtenidos con el AE puro tiene un diámetro mayor casi del doble de la obtenida por el control positivo (Ampicilina) 2,2605 mm ($\pm 0,0092$).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla N° 19 se puede evidenciar que en tres de las cuatro concentraciones empleadas de los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) se presentaron halos de inhibición en contra de la bacteria *Salmonella enteritidis* con medidas iguales o superiores a 2,0 mm en la mayoría de los casos, asimismo, se observa que a diferencia del Agar TSA, en el Agar a base de extracto de Tomate se presenta acción antimicrobiana para todas las concentraciones de AE empleadas.

Tabla 19 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Tomate (*Solanum lycopersicum*).

[] AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000 ppm	1,4307	2,681	2,0559	0,7816	0,8841
10000 ppm	1,8241	0,2531	1,0386	1,2341	1,1109
50000 ppm	2,0827	3,861	2,9719	1,5810	1,2574
AE PURO	2,5687	4,136	3,3524	1,2281	1,1082
Ampicilina	2,254	2,267	2,2605	8,5E-05	0,0092
Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0



Ilustración N° 91 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Tomate (*Solanum lycopersicum*) para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

Las tres moléculas identificadas como él (+)-Espatuleno, Oxido de α -Bisabolol y la Dodecanona en los AE empleados en la realización de la prueba de sensibilidad en el agar con el extracto de Tomate (*Solanum lycopersicum*) se han caracterizado a lo largo del desarrollo de la discusión por su actividad antimicrobiana, sin embargo, el extracto empleado para la realización de este medio según Calatrava (2017) reporta la molécula de 2-tridecanona, que cumple con una función biológica como insecticida natural, disminuye la capacidad infectiva de bacterias que interactúan con las plantas; La 2-TDC afecta a la movilidad y la formación de biopelículas de bacterias.

6.4.3.3. Agar-Agar con extracto de Papaya (*Carica papaya L*)

Finalmente, como se puede observar en la tabla N° 20 los resultados obtenidos para los halos de inhibición en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en Agar-Agar con el extracto de Papaya (*Carica papaya L*) contra el patógeno *Salmonella enteritidis* fueron de 1,7924 mm ($\pm 0,5603$) a una concentración de 5000 ppm; 1,2383 mm ($\pm 0,4410$) a 10000 ppm; 1,5209 mm ($\pm 0,4723$) a 50000 ppm. Para la prueba de sensibilidad realizada con el aceite esencial puro de los tallos por el método de hidrodestilación asistida por radiación de microondas no se presentó halo de inhibición contra *Salmonella enteritidis*, además, es importante resaltar que los resultados obtenidos para el antibiótico Ampicilina (control positivo) presentó un valor promedio

de 9,6631 mm ($\pm 0,3116$), indicativo de la mayor actividad antimicrobiana, en este estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la ilustración N° 92 se puede concluir que para la concentración de 5000 ppm se logró obtener el mayor halo de inhibición en el medio de cultivo a base de extracto de Papaya (*Carica papaya L*), igualmente, se observa una disminución de halo inhibitorio en la concentración de 10000 ppm, sin embargo, también se logra apreciar que el AE en estado puro en comparación con los demás medios de cultivo realizados; no presentó halo de inhibición.

Tabla 20 Resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana para *Salmonella enteritidis* con los AE de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) en Agar-Agar con extracto de Papaya (*Carica papaya L*).

[] de AE	REPLICA 1 (mm)	REPLICA 2 (mm)	Promedio (mm)	Varianza σ^2	Desviación Estándar (\pm)
5000 ppm	1,3962	2,1887	1,79245	0,31393	0,5603
10000 ppm	0,9265	1,5502	1,2383	0,19448	0,4410
50000 ppm	1,1869	1,8549	1,5209	0,22306	0,4723
AE PURO	0	0	0	0	0
C.P Ampicilina	9,4427	9,8835	9,6631	0,09709	0,3116
C.N Tween 80 al 20%	0	0	0	0	0



Ilustración N° 92 Placas de la prueba de sensibilidad en Agar-Agar con extracto de Papaya (*Carica papaya L*) para el patógeno *Salmonella enteritidis*.

El aceite esencial de los tallos de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) obtenido por MWHD y empleado en el cuadrante 4, a diferencia de todos los resultados obtenidos con anterioridad para los diferentes medios de cultivo, evidenció que en su forma pura no presentó actividad antimicrobiana, esto puede ser debido al método de extracción empleado ya que al usar una fuente de calor como el microondas pudo haber generado la pérdida de componentes altamente volátiles, esto puede observarse en la cantidad de compuestos que se obtuvieron en el cromatograma de esta técnica, por lo cual, al comparar los resultados y las pocas moléculas encontradas dentro del espectro y de las cuales no se encontró ninguna que reportara actividad antimicrobiana se determinó que aunque este AE presentó mayor rendimiento no es el que presenta mayor actividad, si se compara con los otros aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) empleados a diferentes concentraciones y los cuales presentan compuestos como (+)-Espatuleno, a-Bisabolol oxido B y la Dodecanona que demostraron sensibilidad microbiana, de igual forma el extracto de Papaya (*Carica papaya L*) según Flores *et al.* (2018) contiene alto contenido de polifenoles totales atribuibles a este tipo de efectos biológicos.

Es importante resaltar lo reportado por MinSalud (2011) en el cual se enuncia la resistencia a los antibióticos durante los años 70 y 80 en donde las cepas de *Salmonella* han demostrado tener una variada susceptibilidad a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y trimetropin sulfato; de esta manera, y según los resultados obtenidos en los últimos 40 años, la resistencia microbiana que presentan las cepas de *Salmonella* respecto a la Ampicilina y su uso frecuente para el control de las infecciones bacterianas ha generado una evolución progresiva en los mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Según lo establecido por Mantilla *et al.* (2010) obtenido de Normas CLSI-NCCLS (2005) indica que los halos de inhibición para el caso de la *Salmonella enteritidis* frente al antibiótico ampicilina se observa el inicio de susceptibilidad cuando el halo de inhibición es mayor a los 16 mm y presenta resistencia cuando el diámetro del halo de inhibición es menor a los 12 mm, con una sensibilidad media de 13-15 mm.

VII. CONCLUSIONES

El rendimiento del aceite esencial de *Siparuna gesnerioides* Kunth A.DC. presenta un alto porcentaje en comparación con otras especies de la misma familia, el valor máximo de obtención de AE en esta investigación fue de 3,6% mediante la técnica de destilación MWHD en hojas y el valor mínimo fue de 0,72% mediante la técnica de SD.

Mediante el análisis de la composición química del aceite esencial de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. obtenido de las hojas y Tallos mediante tres diferentes técnicas de destilación (HD, SD, MWHD) a nivel de laboratorio se identificaron más de 46 compuestos, cuyos componentes de mayor relevancia fueron: (+)-Espatulanol, 10-epi-elemol, Nerolidol, Mircenol, 2-Decanona e Hidroperóxido de *terc*-butilo.

La actividad biológica evidenció que los aceites esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. son efectivos contra microorganismos patógenos gramnegativos como la *salmonella enteritidis* a concentraciones de 50000 ppm, 10000 ppm, 5000 ppm y AE puro; Para las frutas adquiridas por la despulpadora Archila como el Maracuyá, los aceites presentaron halos de inhibición de 1,8134 mm ($\pm 0,4360$) a 5000 ppm, 1,7149 mm ($\pm 0,34832$) a 10000 ppm, 1,5278 mm ($\pm 0,81954$) a 50000 ppm y 2,3102 mm ($\pm 0,65803$) en estado puro; en la Guanábana, los aceites mostraron halos de inhibición 1,6206 mm ($\pm 0,2078$) a 5000 ppm, 1,2336 mm ($\pm 0,2161$) a 10000 ppm, 2,6019 mm ($\pm 0,6343$) a 50000 ppm y 6,6887 mm ($\pm 0,0679$) con AE puro; en la Fresa se observó un halo de inhibición de 4,2001 mm ($\pm 5,939$) con el aceite esencial en su forma intacta. En las frutas obtenidas de manera comercial como el Tomate, los aceites mostraron halos de inhibición de 2,0559 mm ($\pm 0,8841$) a 5000 ppm, 1,0386 mm ($\pm 1,1109$) a 10000 ppm, 2,9719 mm ($\pm 1,2574$) a 50000 ppm y 3,3524 mm ($\pm 1,1082$) en su forma pura; en el Melón se presentó halos de inhibición de 0,5308 mm ($\pm 0,1592$) a 5000 ppm, 0,6661 mm ($\pm 0,0564$) a 10000 ppm, 0,6147 mm ($\pm 0,3039$) a 50000 ppm y 2,002 mm con AE puro. Finalmente, en la Papaya se exhibieron halos de inhibición únicamente para las concentraciones de 5000 ppm (1,7924 mm ($\pm 0,5603$)), 10000 ppm (1,2383 mm ($\pm 0,4410$)) y 50000 ppm (1,5209 mm ($\pm 0,4723$)), según los análisis realizados se debe tener en cuenta la concentración crítica de los AE, ya que este factor

es fundamental para el efecto de las moléculas con propiedades antimicrobianas, al emplear concentraciones bajas de AE's la bacteria presenta alta resistencia bacteriana, de igual forma, se puede concluir que los componentes químicos propios de cada fruta empleada para los extractos le otorgaban mayor capacidad a los AE que ayudan a aumentar el potencial antimicrobiano contra la cepa bacteriana, cabe destacar que estas propiedades dependen de cada fruta que se implementó como base del medio de cultivo, por último, es importante resaltar los resultados obtenidos del control positivo (Ampicilina) ya que se evidenció como la *Salmonella enteritidis* presentó mayor resistencia al antibiótico a comparación de los AE puros de la *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC. obtenidos por los métodos de HD y SD.

VIII. RECOMENDACIONES

Realizar la obtención de los aceites esenciales de la *Siparuna gesnerioides* (Kunth) mediante procesos industrializados dado su alto porcentaje de rendimiento, presencia de compuestos con actividad antimicrobiana, tales como el Epatulenol, 10- epi- elemol, 2-Decanona, Nerolidol, Mircenol e Hidroperóxido de terc-butilo, siendo está una propuesta alternativa al alto grado de resistencia que presentan los microorganismos frente a los fármacos comerciales actuales; se propone realizar pruebas de susceptibilidad microbiana mediante la técnica de microdilución.

Se recomienda la realización de pruebas de diversa naturaleza como lo son: la evaluación del potencial antioxidante, antifúngico, larvicida y antiinflamatorio, dado que en la bibliografía se reportan compuestos con dichas propiedades, así mismo, presenta moléculas químicas que pueden ser implementadas con fines terapéuticos, fragancias y cosméticos, pues las especies de esta familia han presentado actividad en estas áreas mediante extractos y/o aceites esenciales.

De igual forma, se recomienda realizar ensayos con la cepa bacteriana pura con el fin de confirmar los resultados obtenidos de las actividades antimicrobianas.

A demás, es de gran importancia la adecuación y continua mejora al proceso metodológico de extracción de aceites esenciales mediante la técnica de Hidrodestilación asistida por microondas la cual presenta los mejores porcentajes de rendimiento, siendo necesario enfatizar en los tiempos, potencial y técnica de refrigeración.

IX. REFERENCIAS

- Abati Bolzan, A. (2007). *Constituintes de Senecio platensis Arech. Isolamento, Elucidación Estructural e Avaliação da Actividade Antibacteriana*. Santa Maria, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria.
- Alfaro-Mora, R. (2018). Aspectos relevantes sobre Salmonella sp en humanos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 33 - 54.
- Andrade, M., Cardoso, M., Souza, M., Oliveira, C., Batista, L., Soares, M., . . . Figueiredo, A. (2014). Actividad biológica de los aceites esenciales de Cinnamodendron dinisii y Siparuna guianensis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 6.
- Andrade, S. (2017). Aceites esenciales y sus componentes como una alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades. *Biomedica*, 224-243.
doi:<https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3475>
- Arango, W. M., Ruíz, J. M., & Jaramillo, C. A. (2011). Fungicidal activity of Eucalyptus tereticornis essential oil on the pathogenic fungus Fusarium oxysporum. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 264-274. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/262784334_Actividad_antimicótica_de_l_aceite_esencial_a_partir_de_Eucalyptus_tereticornis_sobre_el_hongo_patogeno_Fusarium_oxysporum
- Autino, J., Romanelli, G., & Ruiz, D. (2013). *Introducción a la Química Orgánica*. La Plata: Edulp.

- Barreto, M., Castillo-Ruiz, M., & Retamal, P. (01 de 09 de 2016). Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Scielo*, 11. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n5/art10.pdf>
- Bassolé, I., & Juliani, H. (2012). Aceites esenciales en combinación y sus propiedades antimicrobianas. *Molecules*, 18. Recuperado el 29 de 12 de 2020
- Biocomercio Sostenible. (2003). *Biocomercio Sostenible Estudio del mercado Colombiano de aceites esenciales*. Bogotá-Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt”.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2011). *Microbiología Médica* (25 ed.). México: McGRAW-HILL Interamericana Editores, S.A.
- Brunia, A. (2008). *Patógenos microbianos transmitidos por los alimentos*. USA: Springer.
- Calatrava, M. (2017). *2-tridecanona como molécula señal en sinorhizobium meliloti*. España: Universidad de Granada. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=110493>
- Carrillo, R., Zepeda, A., Flores, O., Díaz, A., González, I., & Araiza, D. (2015). Glicocálix. Una estructura a considerar en el enfermo grave. *evista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia*, 7.
- Castellanos, M., Hernández, J., & Sandoval, A. (2019). *Formulación y Evaluación de la Actividad Bacteriana de un Desinfectante para Superficies obtenido a partir de Aceite Esencial de Eucalipto (Eucalyptus globulus labil)*. San salvador: Universidad del Salvador. Recuperado el 28 de Marzo de 2022

- Cercenado, E., & Saavedra, J. (Agosto de 2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: Conceptos Generales. *ElSevier*, 7(4), 214 - 217. doi: 10.1016/S1696-2818(09)71927-4
- Cerpa , M. (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y Caracterización. *Universidad de Valladolid*, 1-304.
- Choi, H. (2005). Characteristic odor components of kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) peel oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1642–1647. doi:doi.org/10.1021/jf040324x
- CNIB. (2022). *Centro Nacional de Información Biotecnológica*. (PubChem, Productor) Recuperado el 2 de Junio de 2022, de Resumen de compuestos de PubChem para CID 92231, espatulenol.: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Spathulenol> .
- CNIB. (2022). *Centro Nacional de Información Biotecnológica*. Recuperado el 22 de Mayo de 2022, de Resumen de compuestos de PubChem para CID 12741, 2-decanona.: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Decanone> .
- CNIB. (2022). *Centro Nacional de Información Biotecnológica*. Obtenido de Resumen de compuestos de PubChem para CID 10975, Myrcenol.: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Myrcenol> .
- CNIB. (2022). *Resumen de compuestos de PubChem para CID 5284507, Nerolidol*. Obtenido de Centro Nacional de Información Biotecnológica: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nerolidol> .

- CNIB. (2022). Resumen de compuestos de PubChem para CID 92138, Elemol. *Centro Nacional de Información Biotecnológica*. Recuperado el 05 de Junio de 2022, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Elemol> .
- Contreras, V. (2010). *Implementación a nivel laboratorio de una unidad de extracción de volátiles por radiación de microondas*. Durango: Instituto Tecnológico de Durango. Obtenido de <https://doc-10-3o-apps-viewer.googleusercontent.com/viewer/secure/pdf/k5rt55oqkmaokqpk636j1qote5e72o9m/tqv7o38j64dhd6aveat22ggajgpuok25/1655180100000/drive/12278054360445160020/ACFrOgAkJte8YEic55q75IRdT7FVBYAMuSW7GIKRltZLtkYa1cWefV46OBrBOWFVJY08BzDGDmX47U>
- Cortés, M., & Iglesias, M. (2004). *Generalidades sobre Metodología de la Investigación*. Ciudad del Carmen, Campeche, México: Universidad Autónoma del Carmen. Obtenido de https://www.unacar.mx/contenido/gaceta/ediciones/metodologia_investigacion.pdf#:~:text=La%20Metodolog%C3%ADa%20es%20la%20ciencia%20que%20nos%20ense%C3%B1a,darnos%20la%20estrategia%20a%20seguir%20en%20el%20proceso.
- David, H., Díaz, O., Urrea, L., & Cardona, F. (2014). *Guía Ilustrada Flora Cañón del Medellín*, Antioquia , Colombia: Universidad de Antioquia.
- El-seedi, H., Ghia, F., & Torssell, K. (1994). Cadinane sesquiterpenes from *Siparuna macrotepala*. *ELSEVIER*, 1495-1497.

- Enríquez, M., & Orrabalís, C. (2019). Caracterización química del aceite esencial obtenido de la madera de *Bulnesia sarmientoi* Lorenz ex Griseb. (palo santo) recolectado del departamento Matacos, de la provincia de Formosa, Argentina. *Multequina*, 28, 59-66. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/428/42862466009/42862466009.pdf>
- Ferreira, T., Oliveira, E., Tschoeke, P., Pinheiro, R., Maia, A., & Wagner, R. (2017). Potential use of *Negramina* (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honey bees. *Elsevier*, 7.
- Fierro, M., Osorio, C., Fandiño, L., & Rondón, I. (2011). Resistencia Antibiótica en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aisladas de granjas porcícolas en el departamento del Tolima. *Scielo*, 8. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v15n1/v15n1a08.pdf>
- Flores, J., Niño, G., Báez, J., García, K., Gallardo, C., & Castillo, S. (2018). Evaluación antimicrobiana, antioxidante y composición nutricional de subproductos bioprocesados de *Carica papaya* L. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 6.
- Fonseca, R., & Vigosa, J. (21 de Abril de 2015). *Flora de Guerrero*. Recuperado el 15 de Enero de 2020, de <http://biologia.fcien.unam.mx/plantasvasculares/PDF%20FLORAS/64%20Martyniaceae%20y%20Siparunaceae.pdf>
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico* (12 ed. ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

- Franke, A., Munaro, M., Donizete, S., Siqueira, C., Pereira, T., & Souza, R. (2014).
Caracterización Físico- Química de Aceites Esenciales de Guianensis Siparuna
Aublet. *Artigo*, 6.
- Gallegos, F. (2014). “*Resistencia Bacteriana en Pacientes atendidos con Gastroenteritis
por Salmonella spp. en el Hospital Corazón Inmaculado de María, del Cantón El
Chaco*. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Obtenido de
[https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8709/1/Gallegos%20Torres%
20C%20Franklin%20Iv%C3%A1n.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8709/1/Gallegos%20Torres%20C%20Franklin%20Iv%C3%A1n.pdf)
- Gerard, R., MacLean, D., & Antonio, T. (1986). Examination of three Siparuna species
for alkaloid content. *ELSEVIER, Vol.25*, 2155-2156.
- Gil, A., Morón, A., & Gaesrte, Y. (07 de 06 de 2010). Calidad microbiológica en frutas
de conchas comestibles expandidas en mercados populares de los municipios
Valencia y San Diego, estado Carabobo, Venezuela. *Revista de la Sociedad
Venezolana de Microbiología*, 6.
- González, B. (2019). *Intensificación con Microondas del Proceso de Extracción por
Arrastre de Vapor de Aceites Esenciales*. Valladolid, Valladolid, España:
Universidad de Valladolid. Recuperado el 28 de Diciembre de 2020, de
<https://core.ac.uk/reader/228073965>
- Gonzalez, J., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., & Villareal, J. (2014). Aislamiento
microbiológico de Salmonella spp. y herramientas moleculares para su detección.
Salud Uninorte, 3 - 4. Obtenido de
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81730850009>

- Graca, M. (2010). Actividades antioxidantes y antiinflamatorias de los aceites esenciales. *Molecules*, 36. Recuperado el 29 de 12 de 2020, de <file:///C:/Users/HP-PC/Downloads/molecules-15-09252.pdf>
- Guerrero Sandoval, J. (2008). *Composición Química y Antimicrobiana del Aceite Esencial de la Peperomia galioides H.B.K.* Lima, Peru: Universidad Nacional de Ingenierias. Recuperado el 02 de Junio de 2022
- Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C.)*(122), 35 - 41. Recuperado el 18 de Mayo de 2022, de https://www.researchgate.net/publication/39426710_La_cromatografia_de_gases_y_la_espectrometria_de_masas_identificacion_de_compuestos_causantes_de_mal_olor/link/54743bfb0cf2778985abc921/download
- Hernández, K. (18 de 06 de 2013). *Las propiedades nutritivas y medicinales de la guanábana*. Obtenido de <https://www.colombia.com/vida-sana/nutricion/sdi/60415/las-propiedades-nutritivas-y-medicinales-de-la-guanabana>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (6 ed. ed.). México,DF: McGRAW-HILL Interamericana Editores S.A.
- Iñíguez, R., Esqueda, H., & Escoto, T. (2014). Caracterización química de aceites esenciales y extractos de madera de dos especies de pinos del bosque La Primavera. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 42 - 57. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v6n28/v6n28a4.pdf>

- Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Jakupovic, J., Solis, P., Gupta, m., & Bienzle, U. (2003). SÍiparunas A – C, Sesquiterpenoides de Siparuna Pauciflora. *Elseiver*, 6.
- Kumari S, P. S. (2014). *EssOilDB*. doi:10.1093/base de datos/bau120
- Laboratorium Discounter. (2022). *Quimicos Sulfato de sodio*. Recuperado el 30 de Junio de 2022, de <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/n/sulfato-de-sodio/>
- Lang, G., & Buchbauer, G. (2011). A review of the results of recent research (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal*, 13-39.
- Leitão, G. G. (02 de Mayo de 1999). Chemistry and pharmacology of Monimiaceae:. *Journal of ethnopharmacology*, 65, 87 - 102. doi:[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00233-5)
- Linzitto , O., & del Luján, m. (2009). EnteroBacteriaceae en Alimentos. *Revista de Enfermedades Infeciosas Emergentes*, 3, 43-58. Recuperado el 2 de Enero de 2021, de <https://core.ac.uk/reader/294781300>
- Lucas, J. (2017). *Actividad Animicrobiana in vitro de Antiocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas*. Michoacán: Instituto Politecnico Nacional.
- Mahecha, C. (2010). *Actividad Antioxidante y Antibacteriana de Aceites Esenciales Extraídos de Hojas y Frutos de Siparuna sessiliflora*. Bogota, Cundinamarca, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana. Recuperado el 05 de Junio de 2022, de

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/823/cien24.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mantilla, J., Pulido, M., & Jaime, J. (2010). Prueba de sensibilidad antimicrobiana de cepas de Salmonella grupo D (móviles e inmóviles) aisladas de ponedoras comerciales en Colombia. *Revista UNAL*, 10. Obtenido de

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/18252/19836>

Martínez, A. (06 de 2020). *Researchgate*. Recuperado el 30 de 12 de 2020, de

Fitoquímica y Etnofarmacología: Definición de Conceptos y Aplicación a la carrera de Química y Farmacia de la Universidad de La Frontera:

https://www.researchgate.net/publication/342131439_Fitoquimica_y_Etnofarmacologia_Definicion_de_Conceptos_y_Aplicacion_a_la_carrera_de_Quimica_y_Farmacia_de_la_Universidad_de_La_Frontera

Martínez, M. (2003). *Aceites Esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.

Mehdizadeh, L., & Moghaddam, M. (2018). Aceites esenciales: actividad biológica y potencial terapéutico. *Scielo*, 13.

MinSalud. (2011). *Perfil de riesgo Salmonella spp. (no tifoideas) en pollo entero y en piezas*. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia. Obtenido de

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/perfil-salmonella-spp.pdf>

Montoya, G. (2010). *Aceites Esenciales: Una Alternativa de Diversificación para el Eje Cafetero*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia.

- Nascimento, e. a. (Junio de 2018). Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. *Journal of ethnopharmacology*(210), 351–358.
doi:10.1016/j.jep.2017.08.030
- NIST. (2021). *National Institute of Standards and Technology*. Obtenido de Libro del Web de Química del NIST, SRD 69:
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C639996&Units=SI&Mask=2000#Gas-Chrom>
- NITS. (2014). *Libro del Web de Química del NIST*. Obtenido de
<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C6750603&Mask=200#Refs>
- Noriega, P., Guerrini, A., & Ankuash, E. (2014). Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 128 - 137. Recuperado el 28 de Mayo de 2022, de <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2014/cpm142b.pdf>
- Noriega, P., Guerrini, A., & Ankuash, W. (2014). Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10.
- OMS. (03 de 12 de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 30 de 12 de 2020, de Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever->

global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths

- Parra, M., Durango, J., & Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por salmonella. *Revista MVZ Córdoba, Vol. 7*, 15. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/693/69370201.pdf>
- Patrick, M., Mahon, B., Zansky, S., Hurd, S., & Scallan, E. (2010). Montar en carritos de compras y exposición a materias primas productos cárnicos y avícolas: prevalencia y factores asociados con este factor de riesgo de Salmonella e infección por Campylobacter en niños menores de 3 años. *Journal of Food Protection*, 73.
- Pérez, C., Sánchez, W., Murillo, W., & Méndez J. (2017). Acción antioxidante conjunta de extractos etanólicos de *Mollinedia lanceolata*, *Croton leptostachyus* y *Siparuna sessiliflora*. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 7.
- Pinero, M. (02 de 03 de 2022). *Hoja de guanábana: propiedades nutricionales, usos y preparación*. Obtenido de <https://mejorconsalud.as.com/hoja-guanabana-propiedades-nutricionales-usos-preparacion/>
- Polo, L., Ramírez, D., & Álvarez, A. (2019). *Medios de cultivo a partir de residuos agroindustriales sólidos para el crecimiento de la levadura saccharomyces cerevisiae*. Pereira: Universidad Libre Pereira.
- Ramirez, L. S., & Marin, D. C. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* , 263-268.

- Renner, S. (2009). *Siparunaceae neotropicales - Clave interactiva y recursos de información para las plantas con flores del Neotrópico*. Recuperado el 25 de Enero de 2020, de <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Siparunaceae.htm>
- Reyes, J., & Sáenz, A. (2019). *Propiedades Antimicrobianas de Extractos de Hojas de Especies de Passiflora frente a Helicobacter pylori*. Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/46374/Trabajo%20de%20Grado.pdf?sequence=1>
- Rios, S., & Rojas, B. (2017). *Estudio Comparativo de los Aceites Esenciales de dos Especies de Passifloras del Departamento del Huila*. Neiva, Huila, Colombia: Universidad Surcolombiana.
- Rodríguez, E. (2011). Uso de Agentes Antimicrobianos naturales en la conservación de Frutas y Hortalizas. *Revista Ra Ximhai*, 19. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>
- Ruíz, D. (2017). *Composición Química y Actividad Antioxidante de Aceites Esenciales de Cinco Especies de Plantas Cultivadas en Yucatan*. Mérida: Instituto Tecnico de Mérida.
- Ruiz, J. (2019). *Ingeniería Básica de una Planta de Extracción de Aceite Esencial de "Mentha arvensis L." por Destilación de Arrastre con Vapor*. Sevilla: USevilla. Recuperado el 15 de Diciembre de 2020, de <https://core.ac.uk/reader/299806885>

- Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). Actividad Antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica*, 77-100.
doi:<http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 19. Obtenido de
<http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v16n3/rhcm11317.pdf>
- Stashenko, E. (2009). Propiedades y Caracterización. En *Aceites Esenciales* (pág. 88). Bucaramanga, Santander, Colombia : Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales-CENIVAM. Recuperado el 16 de Mayo de 2022
- StashenkoE, Martínez, J., Durán, D., Córdoba, Y., & Caballero, D. (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 17.
- Tafur, J., Torres, J., & Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones Médicas*, 10.
- Toledo, P., Ferreira, T., Bastos, I., Rezende, S., Viteri, L., Didonet, J., . . . Aguiar, R. (2019). Essential oil from *Negramina* (*Siparuna guianensis*) plants controls

aphids without impairing survival and predatory abilities of nontarget.

ELSEIVER, 12.

Torrenegra, M. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar Extraído de Especies de Oregano (*Origanum vulgare*), Oregano “Borde Blanco” (*Origanum vulgare* ssp) y Oreganito (*Lippia alba* mill) Cultivado en la zona norte del Departamento de Bolívar. (*Tesis de Maestría*). Universidad Nacional de Colombia, Cartagena de Indias, Colombia. Recuperado el 28 de Diciembre de 2020, de <https://core.ac.uk/reader/77269480>

Trujillo, M., López, S., Roa, V., Soledad, M., & Cava, R. (2001). Estudio de la estabilidad microbiológica del melón (*Cucumis melo* L) mínimamente procesado por impregnación al vacío. *Scielo*, 173-179. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000200009&lng=es&tlng=es

Vigosa, J. (2015). siparunáceas. Flor de Guerrero 64. *ResearchGate*, 30.

Villalta, C. (2013). *Estudio de la composición química y actividad biológica del aceite esencial Siparuna muricata de la familia de las Siparunaceae en la Provincia de Loja*. Loja, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja. Obtenido de <http://dspace.utpl.edu.ec/jspui/handle/123456789/7711>

X. ANEXOS

Anexo No. 1- Carta de aceptación al XIV Congreso Colombiano de Fitoquímica y I Congreso de Semilleros de Fitoquímica en Instituciones de Educación Media



Universidad de Sucre
INCLUYENTE, INTEGRADA Y PARTICIPATIVA

LA ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
UN COMPROMISO DE TODOS



CARTA DE ACEPTACIÓN

Sincelejo 9/06/2022

Investigador
Jerson Estiven Anzola González

Junto a un cordial saludo el comité científico del XIV Congreso Colombiano De Fitoquímica, I Congreso Colombiano De Semilleros De Fitoquímica En Instituciones De Educación Media, tiene el gusto de notificarle que su ponencia titulada: **Aislamiento, Caracterización y Evaluación de los Aceites Esenciales de *Siparuna gesnerioides* (Kunth) A.DC., como Agente Antimicrobiano contra *Salmonella spp.*** ha sido valorada como pertinente para su exposición en modalidad **POSTER** en el XIV Congreso Colombiano De Fitoquímica 2022.

Esperamos que la institución que usted representa genere las facilidades para participar de este evento; agradecemos su gestión al recibo de la presente comunicación y la confirmación de su participación, la cual será efectiva con el pago de inscripción.

Agradeciendo la atención prestada y su interés en participar.

Atentamente:

Rita L. Márquez Vizcaino
Líder GIPNUS
Presidenta

María S. Parejo Alcocer
Coordinador GIPNUS
Secretaria

XIV Congreso Colombiano de Fitoquímica
I Congreso Colombiano de semilleros de Fitoquímica en Instituciones de educación media

Carrera 28 No.5 – 267 Barrio Puerta Roja – Sincelejo – Colombia

Nit: 892.200.323-9

Cel: 3106569911-3017312733

Página Web: www.unisucre.edu.co

Correo electrónico: fitorita@yahoo.es -
xivcongresofitoquimica@gmail.com

FOR-CO-008_Ver.12.0



Anexo 2. Certificados de participación como ponentes en las jornadas de conferencias denominadas: Diálogos en Ciencia, Tecnología e Innovación organizado por el Programa Semilleros de Investigación Gestores de Conocimiento.



SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN
Gestores de Conocimiento
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

•• A través del convenio de cooperación especial No. 8 de 2020 para el fortalecimiento de las capacidades en ciencia, tecnología e innovación de los semilleros de investigación

Certifica que:
Lina Marcela Rojas Motta
Identificado con documento No.
1.083.927.300

participó en las jornadas de conferencias denominadas
Diálogos en Ciencia, Tecnología e Innovación,
donde se abordaron temáticas relacionadas con Semilleros de Investigación, Ética y Bioética en la Investigación, Formulación de Proyectos y Apropriación Social del Conocimiento,
desarrolladas del 6 al 8 de abril de 2022.
Dado en Neiva a los 19 días del mes de abril de 2022


Olga Patricia Sánchez Rubio
Presidenta RedIES Huila


Diego Andrés Montenegro Garza
Director proyecto Gestores de Conocimiento



SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN
Gestores de Conocimiento
CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN

•• A través del convenio de cooperación especial No. 8 de 2020 para el fortalecimiento de las capacidades en ciencia, tecnología e innovación de los semilleros de investigación

Certifica que:
Jerson Estiven Anzola González
Identificado con documento No.
1.075.299.589

participó en las jornadas de conferencias denominadas
Diálogos en Ciencia, Tecnología e Innovación,
donde se abordaron temáticas relacionadas con Semilleros de Investigación, Ética y Bioética en la Investigación, Formulación de Proyectos y Apropriación Social del Conocimiento,
desarrolladas del 6 al 8 de abril de 2022.
Dado en Neiva a los 19 días del mes de abril de 2022


Olga Patricia Sánchez Rubio
Presidenta RedIES Huila


Diego Andrés Montenegro Garza
Director proyecto Gestores de Conocimiento

