

Especialización en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal



FUNDACIÓN UNIVERSITARIA
JUAN N. CORPAS

Educación y Salud de Calidad
con Sentido Social

Trabajo de grado

**EFFECTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper eriopodon* EN INHIBICIÓN
DEL CRECIMIENTO DE *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton
mentagrophytes***

**ANDREA CATALINA CUERVO CUERVO
DORENNÁ JULISSA GARCÍA VÁSQUEZ
LIBIA JOHANNA OROZCO GÓMEZ
DIANA PATRICIA RAMÍREZ OSPINO**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
ESCUELA DE MEDICINA
TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA VEGETAL
BOGOTÁ D.C.
2017**

**EFFECTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper eriopodon* EN INHIBICIÓN
DEL CRECIMIENTO DE *Trichophyton rubrum* Y *Trichophyton
mentagrophytes***

**ANDREA CATALINA CUERVO CUERVO
DORENNA JULISSA GARCÍA VÁSQUEZ
LIBIA JOHANNA OROZCO GÓMEZ
DIANA PATRICIA RAMÍREZ OSPINO**

TESIS DE GRADO

**VÍCTOR HUGO FORERO SUPELANO
MÉDICO Y CIRUJANO GENERAL, ESPECIALISTA EN MEDICINA FAMILIAR
INTEGRAL, ESPECIALISTA EN GERENCIA Y AUDITORIA**

**LILIANA PAOLA BORREGO MUÑOZ
LICENCIADA EN QUÍMICA, MSc. CIENCIAS BIOLÓGICAS –QUÍMICA DE LOS
PRODUCTOS NATURALES**

**ANTONIO LUIS MEJÍA PIÑEROS
BIOLOGO**

**LUIS MIGUEL POMBO OSPINA
INGENIERO QUÍMICO, MSc. CIENCIAS BIOLÓGICAS-INMUNOLOGÍA
DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS
ESCUELA DE MEDICINA
TERAPÉUTICAS ALTERNATIVAS Y FARMACOLOGÍA VEGETAL
BOGOTA D.C.
2017**

CONTENIDO

RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
1. OBJETIVOS	15
1.1 OBJETIVO GENERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	16
2.2 JUSTIFICACIÓN	17
3. MARCO TEÓRICO	18
3.1 DERMATOFITOSIS	18
3.1.1 DEFINICION	18
3.1.2 EPIDEMIOLOGIA	18
3.1.3 PATOGENIA.....	19
3.1.4 CUADRO CLINICO.....	19
3.1.5 DIAGNOSTICO.....	19
3.1.6 TRATAMIENTO	20
3.1.6.1 Tratamiento tópico	20
3.1.6.2 Tratamiento oral.....	22
3.2 FAMILIA PIPERACEAE.....	22
3.3 METABOLITOS SECUNDARIOS.....	23
3.3.1 DEFINICIÓN.....	24
3.3.2 CLASIFICACIÓN	24
3.3.3 TERPENOS.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1 MATERIALES	28
4.2 METODOLOGÍA.....	28
4.2.1. Recolección e identificación de material vegetal	28

4.2.2. Obtención Aceite esencial.....	29
4.2.3. Determinación de la composición química CG-EM	30
4.2.4. Evaluación de la actividad antifúngica.....	31
5. DESARROLLO DEL PROYECTO.....	33
5.1 Resultados de obtención de aceite esencial.....	33
5.2 Resultados de la evaluación antifúngica.....	33
5.3 Resultados de la composición química del aceite esencial CG-EM.....	35
6. ANALISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO	36
6.1 Actividad Antifúngica.....	36
6.2 Composición química determinada por CG-EM	37
7. DISCUSION.....	44
8. CRONOGRAMA	46
9. CONCLUSIONES	47
10. RECOMENDACIONES	48
11. BIBLIOGRAFIA.....	49
12. ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta Metabólica implicada en la síntesis de los terpenoides.....	25
Figura 2. Piper eripodon	29
Figura 3, Obtención de aceite	29
Figura 4. Hidrodestilación Clevenger modificado	30
Figura 5. Patrón de distribución discos	31
Figura 6. Muestra cómo medir el halo de inhibición	32
Figura 7 A la izquierda T. rubrum ATCC 28188, A la derecha T. mentagrophytes ATCC 9533	33
Figura 8. Inhibición del crecimiento de T. rubrum con el aceite esencial de P. eripodon. A la izquierda con aceite esencia a 5 μ L. A la derecha con aceite esencial 15 μ L	33
Figura 9 Inhibición del crecimiento de T. mentagrophytes con el aceite esencial de P. eripodon. A la izquierda con aceite esencia a 5 μ L. A la derecha con aceite esencial 15 μ L	34
Figura 10. Inhibición del crecimiento de T. rubrum.....	34
Figura 11. Inhibición del crecimiento de T. mentagrophytes	34
Figura 12 Porcentaje de inhibición de AEPE frente a T. rubrum	37
Figura 13 Metabolitos secundarios con Mayor % de área y que presentan un % de coincidencia mayor 90 AEPE.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Resultados de los diámetros obtenidos al exponer por 24 horas cada cepa a 5 μ g de AEPE	35
Tabla 2 Resultados de los diámetros obtenidos al exponer por 24 horas cada cepa a 15 μ g de AEPE	35
Tabla 3 Porcentaje de inhibición de aceite esencial de Piper eripodon con respecto al control para la cepa de Trichophyton rubrum.....	35
Tabla 4 Composición química del aceite esencial de Piper eripodon	36
Tabla 5 Promedio de halos de Inhibición de crecimiento de las cepas al exponerse al AEPE	37
Tabla 6 Clase de metabolitos secundarios aislados AEPE	39

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1 Cromatograma de Metabolitos Secundarios del AEPE	35
Grafica 2 Cromatograma de Caryophyllene	39
Grafica 3 Cromatograma de α -Ocimene	40
Grafica 4 Cromatograma de α -Pineno	40
Grafica 5 Cromatograma de α -Copaene	40
Grafica 6 Cromatograma de γ -elemene	41
Grafica 7 Cromatograma de alloaromadendrene	41
Grafica 8 Cromatograma de Limoneno	41
Grafica 9 Cromatograma de Acetato de miternol	42
Grafica 10 Cromatograma de p-Cimoneno	42
Grafica 11 Cromatograma de B-tujeno	42
Grafica 12 Cromatograma de Cosmene	43
Grafica 13 Cromatograma de α -Linolol	43
Grafica 14 Cromatograma de α -terpineno.....	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado Herbario Nacional	36
--	----

GLOSARIO

ACEITE ESENCIAL: son las fracciones líquidas volátiles, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas, los aceites son mezclas de compuestos alifáticos de bajo peso molecular, Mono terpenos, Sesquiterpenos y fenilpropanos. En su gran mayoría son de olor agradable, pero algunos pueden tener componentes azufrados con olor relativamente desagradable como el ajo y la cebolla(1)

AGENTE FUNGICIDA: tienen la capacidad de actuar en la membrana del hongo bloqueando la síntesis de uno de sus componentes el ergosterol. Existen diferentes clases de anti fúngicos(2)

DERMATOFITOS: Hongos caracterizados por afectar la estructura de la queratina, existen 3 grandes géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermofiton* los dermatofitos son hongos filamentosos, potencialmente patógeno para el hombre y los animales, con gran capacidad de adaptación a condiciones ambientales. Tiene afinidad con estructuras queratinizadas.

DERMATOFITOSIS: también llamada tiña o tinea (término creado por los romanos para referirse al aspecto clínico de la tiña de cabeza), es una infección superficial en la piel, ocasionada por hongos dermatofitos que afectan la queratina (piel, pelo y uñas)(3)

EFFECTIVIDAD: Mide la capacidad que una población se beneficie de un intervención médica, para la resolución de un problema de salud determinado bajo condiciones ideales, se establece de manera experimental.(4)

ERGOSTEROL: Es el más importante esterol producido por los hongos, pero es el componente que producen en menor cantidad. El ergosterol ocurre como un componente de las membranas celulares de los fúngicos por lo que está inherentemente relacionado con el crecimiento de las hifas y las biomasas. También es un buen candidato como químico para medir el crecimiento fúngico en la comida y materiales en descomposición.(5)

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO: es la capacidad de interferir en el crecimiento y supervivencia de microorganismos, por diferentes herramientas físicas o químicas, mediante la interacción específica con alguno de sus componentes celulares.(6)

TERBINAFINA: Agente antimicótico que pertenece a la familia de las alilamimas inhibe la enzima escualenoepoxidasa, inhibiendo la biosíntesis de ergosterol,

medicamento aprobado por FDA para administración en el tratamiento de onicomicosis por dermatofitos.(7)

TRYCHOPHYTON RUBRUM: es un hongo dermatofito antropofílico (afecta al ser humano), agente causal en casi el 80 % de los casos en tiñas del cuerpo, de la ingle, de los pies, así como de onicomicosis. El género *Trichophyton*, productoras de tricofitias parasitan la piel, uñas y pelo. (8)

ABREVIATURAS

AEPE	Aceite esencial de <i>Piper eripodon</i>
ATCC	American Type Culture Collection
CG- EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
EI	Impacto electrónico
IR	Índice de retención
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
UFC	Unidades Formadoras de colonia

RESUMEN

El interés en las plantas medicinales como fuente antimicrobiana, surge gracias al aumento de la resistencia de agentes infecciosos a la farmacología convencional y al desarrollo etnobotánico (9). El género *Piper* ha sido ampliamente utilizado en la medicina etnobotánica apoyados en sus propiedades antibacterianas y antivirales; esto a pesar de no contar con una validación científica (10). Otros estudios han demostrado el potencial efecto antifúngico del aceite esencial del género *Piper*.

La especie de *Piper eriopodon* perteneciente a la familia Piperáceae y al género *Piper*, son arbustos o pequeños árboles aromáticos; sus hojas son alternas pubescentes, simples; las flores se organizan en inflorescencias espiciformes (forma de espiga). Las especies de *Piper* se distribuyen generalmente en selvas tropicales o bosques nubosos(10)

Se plantea como objetivo evaluar la actividad anti fúngica del aceite esencial de las hojas de *Piper eriopodon* frente a *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

El esquema propuesto para el desarrollo de esta investigación está basado en un estudio analítico primario, previo análisis de la información pertinente al género *Piper*, se recolecta e identifica el material vegetal, obteniendo inmediatamente el aceite esencial por hidrodestilación. Luego se identifican los componentes AEPE (aceite esencial de *Piper eriopodon*) por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Finalmente se evalúa la actividad antimicótica mediante la técnica Kirby Bauer sobre dos cepas (*Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*).

El aceite esencial de *Piper eriopodon* presentó un porcentaje de inhibición comparado con el control frente a la cepa de *T. rubrum* de 19% con 5 µL de AEPE y de 33 % con 15 µL de AEPE.

Palabras clave: Dermatofitosis, *Piper eriopodon*, Terbinafina, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por dermatofitos son comunes en todo el mundo y son la causa predominante de infecciones por hongo en los tejidos queratinosos (piel, cabello y las uñas). Estas infecciones conducen a una variedad de manifestaciones clínicas, tales como tiña pedis, tiña corporis, tiña cruris, granuloma de Majocchi, tiña capitis y tiña ungueal, con tendencia a la cronicidad (11). Estas dermatofitosis son un motivo frecuente de consulta; su prevalencia sigue aumentando considerablemente (> 20 % de la población mundial) (12), afectando a más de 900 millones de individuos (13). *Trichophyton rubrum*, ha sido el dermatofito más común desde los años cincuenta del siglo pasado, representando el 80 – 90 % de las cepas aisladas (14).

Los fármacos utilizados contra dermatofitosis tienen varios efectos secundarios, una eficacia limitada y son muy costosos (14). La terbinafina se considera como el fármaco de primera línea para el tratamiento de la tiña; estudios realizados encontraron una eficacia clínica de solo el 43% (15) y efectos secundarios como: dolor de cabeza, dermatitis, trastornos gastrointestinales, trastornos del gusto y anomalías en las enzimas hepáticas (16) (17).

Esto nos ha conducido a buscar alternativas de manejo, partiendo del conocimiento de que los extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos secundarios de diferentes especies del género *Piper* han mostrado actividad anti-fúngica (14)(18). En Colombia, el género *Piper* se encuentra ampliamente distribuido en bosques húmedos y tropicales, principalmente en la región del Chocó, los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca, seguido por la región andina de la zona montañosa del país (19). Este género es ampliamente utilizado en la medicina etnobotánica apoyados en sus propiedades antibacterianas y antivirales para el manejo de diversas infecciones del tracto respiratorio superior, tracto urinario, enfermedades de transmisión sexual, así como antiséptico y desinfectante para heridas, como también para problemas digestivos; esto a pesar de no contar con una validación científica (10). Estudios realizados han encontrado en el género *Piper* una amplia actividad anti-fúngica y estudios fotoquímicos han descrito el aislamiento de metabolitos con efectos antimicóticos (14)(18) los cuales ameritan seguir investigándose.

Teniendo en cuenta la problemática existente sobre la dermatofitosis y basados en las propiedades del género *Piper* identificadas en diversos estudios se planteó

determinar la efectividad del aceite esencial del *Piper eriopodon* en la inhibición del crecimiento del *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Para lograrlo, se realizaron los procesos de recolección e identificación del material vegetal, obtención del aceite esencial a partir de las hojas frescas de *Piper eriopodon*, determinación de metabolitos secundarios por CG-EM y análisis biológico que determina los metabolitos secundarios involucrados en la actividad anti-fúngica del aceite esencial.

Este trabajo pretende ser el inicio de futuras investigaciones sobre el potencial efecto antifúngico del aceite esencial del *Piper eriopodon*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Piper eriopodon* en la inhibición del crecimiento de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.2.1. Recolectar el material vegetal y verificar que la especie vegetal corresponde a *Piper eriopodon*.
- 1.2.2. Obtener el aceite esencial de las hojas de *Piper eriopodon* mediante la hidrodestilación.
- 1.2.3. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de hojas por medio de CG-EM

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La dermatofitosis son infecciones superficiales cutáneas fúngicas confinadas a las estructuras queratinizadas de la piel llamada comúnmente “Tiña” y conducen a una variedad de manifestaciones clínicas con tendencia a la cronicidad. Son un motivo frecuente de consulta médica afectando a más de 900 millones de individuos , cerca del 20-25 % de la población mundial y su prevalencia sigue aumentando considerablemente (12). Se estima que una persona tiene un riesgo del 10% al 20 % de adquirir una infección por dermatofitos (20).

Dentro de las manifestaciones clínicas más frecuentes encontramos:

Tiña del pie: es una infección que inicia generalmente en los espacios interdigitales laterales del pie o en la superficie plantar de las caras laterales de los dedos, el síntoma principal es el prurito, el pie suele agrietarse y la piel pueden estar muy macerada; en algunos casos se forman ampollas y el prurito es más intenso, sobre todo cuando el responsable es *T. mentagrophytes*. La infección puede propagarse al dorso del pie. La afectación de la planta es frecuente en las infecciones por *T. rubrum*. La evolución de la infección es variable, dentro de las complicaciones principales son la celulitis bacteriana y la invasión micótica de las uñas (onicomicosis), de la piel del dorso del pie y de la pierna y el pie de atleta (13)

Tiña corporis: esta dermatofitosis produce distintas manifestaciones clínicas variando según la zona afectada, se caracteriza por un borde notorio que puede contener pústulas o pápulas foliculares y el centro estar menos inflamado y descamado. Su localización más frecuente son el tronco y las piernas. El prurito es variable y las lesiones pueden ser únicas o múltiples. La dermatofitosis por *T. rubrum* son menos inflamatorias y mal delimitadas.(13)

La Onicomicosis o infección micótica de las uñas, afecta especialmente a las personas con infecciones adyacentes de los dedos del pie o de la piel palmar. La presentación clínica más frecuente es la onicomicosis distal y subungueal, en el que la placa ungueal es invadida desde los bordes laterales y distales. La causa más frecuente es *T. rubrum*, que suele acompañar a una enfermedad crónica, y la infección afecta toda la placa ungueal (13).

El tratamiento para la dermatofitosis con terbinafina tiene una eficacia clínica reducida (43%) , alto costo y múltiples efectos secundarios, pensando en esto se plantea buscar métodos de tratamiento alternativo con farmacología vegetal

partiendo de la base que el género *Piper* tiene una conocida efectividad antifúngica, pero no ha sido evaluada la efectividad del aceite esencial de *Piper eripodon* en la inhibición del crecimiento de *Trichophyton rubrum* que representa entre el 70 y 90% de las infecciones por tiña en todo el mundo, (20) y *Trichophyton mentagrophytes* que es el causante de la forma inflamatoria de la tiña.

2.2 JUSTIFICACIÓN

La infección por *Trichophyton rubrum*; dermatofito causante de infecciones superficiales de la piel y agente comúnmente involucrado en la tiña pedis, y la infección por *Trichophyton mentagrophytes*; causa más común de una forma inflamatoria de esta, representan un reto terapéutico, dadas las limitadas opciones farmacológicas, los efectos secundarios y los altos costos de los mismo; es por ello, que a través de la comparación de la actividad antimicótica del *Piper eripodon* frente a la terbinafina; esta investigación busca crear bases sobre las cuales se puedan generar medios terapéuticos dentro de la farmacología vegetal con potencial efecto antimicótico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 DERMATOFITOSIS

3.1.1 Definición

Los dermatofitos son hongos que pueden invadir el estrato córneo de la piel u otros tejidos queratinizados derivados de la epidermis, como el pelo o las uñas. Pueden causar infecciones (dermatofitosis) en la mayoría de las zonas cutáneas, aunque suelen afectar sobre todo los pies, la región inguinal, el cuero cabelludo y las uñas. (13)

3.1.2 Epidemiología

Los dermatofitos se han dividido clásicamente en antropofílicos, zoofílicos y geofílicos en función de su hábitat primario. Los dermatofitos antropofílicos están asociados a infecciones en humanos y raramente en animales. Los zoofílicos normalmente infectan animales y ocasionalmente humanos. Los geofílicos están primariamente asociados a materiales queratinizados como pelo, plumas, pezuñas o astas y pueden producir infección en el hombre y los animales. (21)

Los dermatofitos que son patógenos naturales en el ser humano son la causa más frecuente de dermatofitosis humana y se clasifican en 3 géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*. (21)

El género *Trichophyton* es el más frecuente de los 3 géneros implicados en la patología humana, con cerca de 30 especies, de las que menos de 10 son responsables de las dermatofitosis humanas. Las especies *T. rubrum* y *T. mentagrophytes complex* (*T. mentagrophytes var. interdigitale* y *T. mentagrophytes var. mentagrophytes*) son las más frecuentes en nuestro medio, siendo responsables de la mayoría de los casos de tinea pedis, tinea ungueal y tinea corporis. *T. rubrum* produce una colonia lisa, granular o algodonosa de color blanco o crema y en el reverso presenta un característico pigmento rojo que le da el nombre (*rubrum*), presenta escasas macroconidias y las microconidias tienen forma de maza, son piriformes o alargadas y la prueba de la ureasa para esta especie es negativa. *T. mentagrophytes var. interdigitale* crece en los medios habituales formando colonias de color blanco-crema, algodonosas, sobre elevadas que se extienden rápidamente; también hay zonas lisas y granulares, mientras que el reverso presenta un pigmento claro, amarillo o amarillo-marrón. Las microconidias tienen forma de perla o lágrima y dan positiva la prueba de la ureasa; también pueden aparecer hifas en espiral y las macroconidias habitualmente están ausentes. *T. mentagrophytes var. mentagrophytes* es muy similar a la anterior, las colonias son granuladas y pulverulentas, de color crema y con un pigmento en el

reverso que va desde el amarillo hasta el marrón. Presenta escasas macroconidias y abundantes microconidias en forma de lágrima o alargadas, dispuestas a lo largo de las hifas y formando estructuras conocidas como “acladium”, también son frecuentes los “zarcillos” (hifas en espiral) y la prueba de la ureasa es positiva. (21)

3.1.3 Patogenia

En los seres humanos se produce mediante artrosporas, que son células vegetativas con paredes celulares gruesas formadas por hifas de dermatofito. Es probable que estas estructuras se desprendan del huésped primario mediante la descamación de las escamas cutáneas o del pelo. Se ha demostrado que las artrosporas de los dermatofitos pueden sobrevivir durante un período de tiempo considerable fuera del huésped, en algunos casos más de 15 meses. No es necesario un contacto directo con la persona infectada para que se produzca la dermatofitosis. No se conoce bien el propio proceso de contagio, pero parece que tras la adhesión de las células fúngicas a los queratinocitos se produce la invasión cutánea, un proceso que es máximo después de unas 2-3 horas. Los queratinocitos de distintas zonas no parecen diferir en su capacidad de unión a las artrosporas. La germinación posterior provoca la invasión. (13)

3.1.4 Cuadro Clínico

La lesión característica de la dermatofitosis es una macula anular con descamación y un borde elevado con un grado variable de inflamación y con el centro habitualmente menos inflamado que el borde. La palabra «*tiña*» se emplea para denominar las infecciones por dermatofitos y suele ir acompañada de la descripción en latín de la localización, así: en cuero cabelludo (*tiña capitis*), en vello facial (*tiña de la barba*), en la cara (*tiña de la cara*), en el tronco y las extremidades (*tiña corporis*), en la ingle (*tiña cruris*), pies (*tiña pedis*), en las manos (*tiña manuum*), y en uñas (onicomicosis). (22)(13)

El aspecto clínico de la infección varía según su localización, la especie de hongo responsable y la respuesta inmunitaria del huésped. Los hongos zoófilos suelen producir lesiones inflamatorias, y en algunos casos pueden formarse grandes lesiones pustulosas (queriones). Por el contrario, las lesiones causadas por los dermatofitos antropófilos suelen mostrar escasa inflamación y pueden cronificarse. (13)

3.1.5 Diagnostico

En algunos casos es posible realizar un cribado de los pacientes con infecciones del cuero cabelludo mediante una fuente de luz ultravioleta con filtro (luz de Wood). Las infecciones causadas por el género *Microsporum* producen una fluorescencia verde. Sin embargo, las infecciones por *Trichophyton* no producen fluorescencia,

con excepción de la tiña favosa, en la que los cabellos son amarillentos. Como los cabellos fluorescentes están infectados, la exploración con luz de Wood puede resultar útil como método para seleccionar los cabellos para microscopía y cultivo.(13)

El diagnóstico debe realizarse con un examen microscópico directo del raspado de la lesión, pelos o uñas, mediante KOH (al 10-30%, suplementado con glicerol) o mediante blanco de calcoflúor. Este tipo de examen es una técnica fácil y rápida para establecer un diagnóstico presuntivo que orientará al clínico en su tratamiento. El examen microscópico directo también puede realizarse con otros colorantes como tinta azul o negra, azul de lactofenol o rojo Congo. Paralelamente a la observación microscópica, las muestras deben sembrarse en agar Sabouraud con cloranfenicol y agar Sabouraud con cloranfenicol y actidiona. Este último inhibe los hongos contaminantes que pudieran encontrarse en la muestra, pero nunca debe utilizarse solo. Los medios inoculados deben incubarse a 30 °C durante 1 mes y ser revisados 2 veces por semana. Cuando se observe crecimiento de colonias compatibles con dermatofitos debe realizarse el examen microscópico pertinente con el fin de encontrar estructuras características y llegar a la identificación de género y especie, si es posible (21).

Las técnicas de PCR altamente sensibles, contribuyen a dilucidar si infecciones subclínicas por dermatofitos podrían estar involucrados en el desarrollo de lesiones eccematosas, psoriáticas o hiperqueratosis, adicionalmente en casos de PCR positiva de muestras de piel intacta podrían considerarse como una colonización por dermatofito.(21)

3.1.6 Tratamiento

El método habitual para tratar las infecciones por dermatofitos es con fármacos tópicos si es posible, pero la mayoría de las infecciones ungueales y todas las del pelo, así como las dermatofitosis generalizadas, precisan tratamiento por vía oral (13)

3.1.6.1 Tratamiento tópico

El tratamiento tópico, es útil en los casos de lesiones limitadas, superficiales y situaciones como embarazo, lactancia o interacciones con otros fármacos orales. El tratamiento tópico se puede utilizar como apoyo del tratamiento oral y como profilaxis, una vez haya terminado éste, con el fin de evitar las recidivas. Los antifúngicos tópicos retrasan el crecimiento de los dermatofitos, que finalmente son eliminados con el recambio dérmico. Son bien tolerados en general, requieren una sola aplicación diaria y se consigue la curación en el 80% de los casos. Entre los

antifúngicos tópicos más utilizados se encuentran imidazoles y derivados, alilaminas, morfolinas y una amplia miscelánea (ciclopiroxolamina, griseofulvina tópica, haloprogrina, tolnaftato, ácido undecilénico y pomada de Whitfield) (21)

La griseofulvina sigue siendo el tratamiento de elección para la tinea capitis, seguido de itraconazol y terbinafina (no activa frente a varias especies de *Microsporum*). En el caso de tinea ungueal la griseofulvina no es tan útil, pues son necesarios tratamientos muy prolongados que no se aconsejan debido a su toxicidad, además no hay una gran respuesta clínica y presenta una elevada tasa de recurrencias. La terbinafina sigue siendo el antifúngico más útil frente a la onicomycosis por dermatofitos, seguido de itraconazol y fluconazol.(21)

Por lo general, el tratamiento tópico de la tiña del pie debe prolongarse durante un mínimo de 2 a 4 semanas. La terbinafina tópica puede utilizarse para eliminar las lesiones de la tiña del pie en 7 días y también se emplea como una solución formadora de película en dosis única aplicada en las plantas de los pies. La tiña inguinal suele responder en 2-3 semanas desde el comienzo del tratamiento. El tratamiento tópico suele ser ineficaz en las infecciones ungueales y del cuero cabelludo, aunque se han notificado curaciones de infecciones ungueales con azoles por vía tópica. Existen otras tres formulaciones de posible utilidad para la onicomycosis. La primera consiste en aplicar una solución tópica ungueal de tioconazol al 28%, que logra remisiones clínicas y micológicas. La segunda es una combinación de urea al 40% y bifonazol. La urea es un potente hidratante y ablanda la uña si se aplica de forma oclusiva. Puede utilizarse una pasta de urea al 40% para erradicar las zonas de infección residual tras el tratamiento de la onicomycosis por vía oral. Por último, las soluciones con potenciadores de la penetración, como ciclopiroxolamina y amorolfina, usados sobre todo como laca de uñas, son eficaces en algunos casos iniciales de infección ungueal por dermatofitos y *Candida*; pueden aplicarse una o dos veces a la semana y cada vez se usan más como tratamiento combinado con fármacos por vía oral en las infecciones graves (13)

El tratamiento sistémico es más efectivo que el tópico y se aplicará en los casos de lesiones extensas, hiperqueratósicas, zonas inflamatorias o con foliculitis, así como en los casos de tinea capitis o tinea ungueal. (21)

3.1.6.2 Tratamiento oral

Los principales fármacos antifúngicos por vía oral utilizados para las dermatofitosis son terbinafina, itraconazol y fluconazol. La griseofulvina es un tratamiento alternativo, pero sigue siendo de elección en la mayoría de los casos de tiña del cuero cabelludo, se administra a dosis de 10-20 mg/kg/día en forma de comprimidos o de jarabe. La terbinafina se administra a dosis de 250 mg/día durante 2 semanas para la tiña inguinal o corporal, durante 6 semanas para la infección ungueal de las manos y durante 12 semanas para las infecciones de las uñas de los pies, es muy eficaz en las infecciones del cuero cabelludo por *Trichophyton*, pero es menos activa frente a *Microsporum*, para lo que se recomienda una dosis doble y prolongar el tratamiento hasta 4 semanas. Produce remisiones rápidas y duraderas en las dermatofitosis de tipo seco y en otras infecciones cutáneas. El itraconazol puede administrarse de forma continua a dosis de 200 mg/día y es curativo para la tiña inguinal o corporal en 1 semana. Se administra como tratamiento pulsado en la onicomycosis. También puede utilizarse el fluconazol como tratamiento de las dermatofitosis, pero los protocolos habituales emplean 150-300 mg a la semana para las infecciones cutáneas. Los tres fármacos se toleran bien y presentan un riesgo bajo de lesión hepática (inferior a 1:70.000). De modo excepcional, la terbinafina puede alterar el sentido del gusto. Todos demuestran pruebas de su eficacia (13)

La onicomycosis causada por dermatofitos puede tratarse por vía oral. La terbinafina y el itraconazol han sustituido a la griseofulvina en esta indicación. Por ejemplo, la terbinafina logra tasas de curación del 70-80% en 6 semanas en las uñas de la mano y en 12 semanas en las uñas del pie. El itraconazol también es eficaz en las infecciones ungueales de los pies a una dosis de 200 mg/día durante 3 meses. Sin embargo, en las infecciones ungueales se suele administrar en forma de «pulsos» durante 1 semana al mes a una dosis de 400 mg/día, que se repite una vez más para las infecciones ungueales de la mano (dos pulsos) y dos o tres veces más en las uñas del pie (tres o cuatro pulsos). Las tasas de remisión descritas superan el 60%. En el tratamiento de la onicomycosis se emplean regímenes intermitentes con fluconazol (300 y 450 mg/semana). (13)

3.2 FAMILIA PIPERACEAE

Diferentes estudios han evidenciado la actividad biológica de algunas especies de la familia Piperáceae; entre las propiedades más destacadas se encuentran: antioxidante, antibacteriana, antitumoral, antiinflamatorio, antifúngico, antimalárico, analgésica, entre otras (10) (13)

La familia Piperáceae, son plantas originarias del sudoeste de la India, son una de las más grandes, importantes y antiguas en la historia de la humanidad, comprenden de 10 a 12 géneros y cerca de 1200 especies, de las cuales 700 corresponden al género Piper (12) (13) (14)

Los principales géneros de esta familia son *Piper* y *Peperomia*, que están presentes en la flora colombiana. Las variedades pueden ser hierbas, arbustos o enredaderas, rara vez son árboles; crecen en climas tropicales, subtropicales templados y habitan en las selvas húmedas de ambos hemisferios (23).

La especie *Piper eriopodon*, hace parte del reino plantae, pertenece al Phylum Magnoliophyta, a la clase Magnoliopsida, al orden de los Piperales, a la familia Piperáceae, al género *Piper* y su Epiteto específico *eriopodon* (24).

El género *Piper* se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales del mundo, en los trópicos de América se han encontrado la gran mayoría. En Colombia se encuentran distribuidas en la región Caribe y al norte de los andes, específicamente en el Choco, Valle de Cauca y Cundinamarca donde se presentan altas precipitaciones y bosques húmedos (24).

Colombia por presentar una gran riqueza forestal, posee algunas especies de la familia Piperáceae las cuales han sido usadas en forma de infusiones, decocciones, entre otros preparados como jugos y lociones, para el tratamiento de algunas enfermedades o malestares sin demostrarse aun su efectividad a nivel científico (24).

Según investigaciones previas el género *Piper* presenta variados compuestos como los lignanos, neolignanos, propenilfenoles, kawapironas, flavonas, flavanonas, entre otros. (24)

3.3 METABOLITOS SECUNDARIOS

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) (26).

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (26).

En los vegetales el metabolismo secundario es muy importante puesto que da lugar a productos (determinados metabolitos secundarios) que resultan de sumo interés

desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario (27).

3.3.2 Clasificación

Se agrupan en cuatro clases principales.

Terpenos; entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales. Compuestos fenólicos; tales como cumarinas, flavonoides, lignina y taninos, Glicósidos como saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos y Alcaloides (26).

3.3.3 Terpenos

Los terpenos más comunes en los aceites esenciales son aquellos de menor peso molecular, y por lo tanto más volátiles, es decir monoterpenos y sesquiterpenos. En ocasiones pueden aparecer también diterpenos lo suficientemente volátiles como para ser extraídos mediante las técnicas habitualmente empleadas. Sin embargo, hay discrepancias en cuanto a incluirlos como componentes del aceite esencial propiamente dicho (27).

Se han identificado como producto del metabolismo secundario de los vegetales, aunque no exclusivo de ellos. Son bastante frecuentes en representantes de familias de Angiospermas como Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Rubiaceae. Se han descrito también en hongos y plantas no vasculares, aunque en menor medida. (27).

Se han determinado los tiempos de vida de las reacciones de varios terpenos con radicales $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_3$ y ozono; los compuestos más comúnmente emitidos y la vida media de éstos es relativamente corta comparada con otras especies orgánicas, debido a la presencia de dobles enlaces lo que los hace susceptibles al ataque de oxidantes. (28)

El isopreno, los monoterpenos, los sesquiterpenos y otros pueden ser muy reactivos bajo condiciones atmosféricas determinadas, como se refleja en sus vidas medias, las que pueden ir desde pocos minutos hasta años.(28)

El ácido mevalónico fue el primer compuesto identificado de los involucrados en la síntesis de los terpenos. Tras el hallazgo de otros intermediarios en el proceso de biosíntesis como acetil Co-A, aceto-acetato, y B-hidroxi-B-metilglutaril-CoA (HMGCoA), se estableció la ruta metabólica implicada en la síntesis de los terpenos que aparecen en la (*Figura 1*). En ella el hidroximetilglutaril CoA origina el isopentenil-pirofosfato (IPP, isopreno biológicamente activo) que junto con el dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP) dan lugar a todos los terpenoides. El DMAPP sirve de compuesto de partida y el IPP proporciona todas las unidades que se repiten. La unión más frecuente que se produce entre estos compuestos es la ya mencionada

“cabeza-cola” en la que intervienen el carbono 1 del IPP y el carbono 4 del DMAPP. A partir de estos compuestos y por sucesivas uniones con moléculas de IPP originan los diferentes tipos de terpenoides existentes. En la actualidad esta ruta está reconocida internacionalmente, pero los estudios investigativos sobre las enzimas, ciclaciones e intermediarios que intervienen en la síntesis de terpenos siguen estando desactualizados. (27)

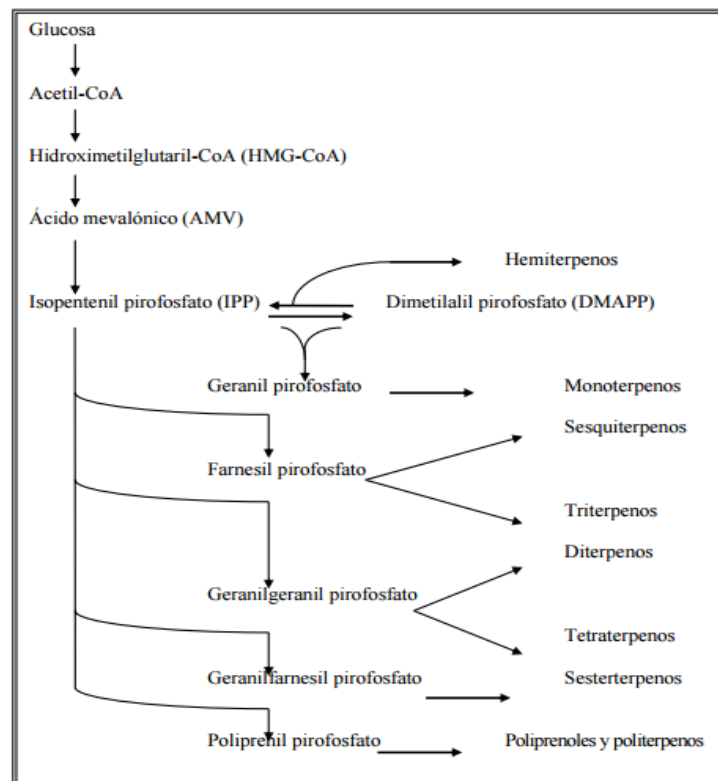


Figura 1. Ruta Metabólica implicada en la síntesis de los terpenoides

3.3.3.1 Monoterpenos

Los monoterpenos, quienes pertenecen a la clase bioquímica de los isoprenoides (terpenoides) cuyo esqueleto carbónico característico está compuesto de una unidad con cinco carbonos (C5). Los terpenos se originan por polimerización enzimática de dos o más unidades de isopreno, ensambladas y modificadas de diversas maneras. La mayoría de los terpenos tienen estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí, no solo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono. (29)

Los monoterpenos, terpenos de 10 carbonos son mejor conocidos como componentes de las esencias volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que ellos forman parte de hasta el 5% en peso de la planta seca. (27)

Esta gran familia de compuestos se puede clasificar atendiendo al tipo de uniones que presentan. Se habla de monoterpenos regulares cuando se originan por la fusión “cabeza-cola” de dos unidades de isopreno, es decir, enlazando el carbono 1 de la primera unidad de IPP y el carbono 4 de la segunda, y se denominan irregulares cuando la fusión es del tipo “cabeza-mitad”, el carbono 1 de la primera unidad de isopreno y el carbono 2 ó 3 del segundo. A partir de esta primera diferenciación se pueden subdividir atendiendo al número de ciclos que presentan: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. (27).

3.3.3.2 Sesquiterpenos

Se caracterizan por poseer 15 átomos de carbono y por tanto tres unidades de isopreno. Aunque por regla general la mayoría de ellos presentan una unión regular “cabeza-cola”, existen algunos que son el resultado de transposiciones en esta estructura. Aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza, se encuentran en los aceites esenciales, al igual que los monoterpenos, pero con mayor frecuencia que estos en hongos, plantas no vasculares e incluso en algunas bacterias como *Streptomyces*. Este grupo presenta gran variabilidad natural pudiendo encontrar hidrocarburos, alcoholes, cetonas y sus derivados, ésteres, glicósidos y alcaloides sesquiterpénicos(27).

Aunque se les han atribuido diversas funciones como hormonas vegetales (ácido abscísico o fitoalexinas) y como antibióticos de origen fúngico, al igual que los monoterpenos pueden actuar como alelopáticos. No son metabólicamente inertes, se sintetizan y catabolizan rápidamente con papel dinámico en el metabolismo vegetal. La producción y acumulación de este tipo de compuestos, en cantidades considerables, suelen estar relacionados con la presencia de estructuras secretoras especializadas, como las glándulas de aceite comentadas anteriormente (27).

Los sesquiterpenos, al contar con una unidad de isopreno más que los monoterpenos, presentan una mayor plasticidad en su construcción que se traduce en una mayor variabilidad estructural y funcional. Además, la presencia de isómeros geométricos de posición u ópticos es mucho mayor (27).

3.3.4 Actividad biológica del *Piper eripodon*

Los extractos etanólicos de hojas, madera e inflorescencias de la especie *Piper eripodon* mostraron ser activos contra hongos tales como *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, inhibiendo el crecimiento micelial de este fitopatógeno. El extracto de inflorescencias de dicha especie vegetal mostró un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos. En el género *Piper* se ha encontrado compuestos de

tipo amida como la pirrolidina presente en la especie *P. aduncum* y que posee propiedades antifúngicas. (30).

A pesar del uso etnobotánico que tienen especies del género *Piper* en Colombia se han llevado a cabo pocos estudios acerca de cuáles de sus compuestos poseen actividad biológica, y en el caso de *Piper eriopodon* son muy pocos los estudios realizados sobre los compuestos presentes en esta especie (30)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

Material vegetal: Hojas frescas de *Piper eriopodon*

Material de laboratorio: Microcروpipetas. Pinzas. Sensidiscos blancos estériles. Puntas para micropipetas. Cajas de Petri.

Equipos: Hidrodestilador tipo Clevenger modificado. Cromatógrafo de gases. Balanza de precisión. Incubadora.

Reactivos: Agar Mueller Hinton. Agar Tripticasa de Soya. Agua peptonada. Agua destilada

Microorganismos: Cepas *Trichophyton rubrum* ATCC28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Fármacos: Antimicótico Terbinafina comprimidos de 250 mg

4.2 METODOLOGÍA

Tipo de estudio: Analítico primario, la evaluación actividad antifúngica se realizó mediante dos procesos, la primera parte obtención del aceite esencial a partir de las hojas frescas de *Piper eriopodon* y la determinación de metabolitos secundarios por medio CG-EM y la segunda parte del estudio el análisis biológico que evaluó la potencial actividad antifúngica del aceite esencial frente a las cepas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

4.2.1. Recolección e identificación de material vegetal

Las Hojas frescas de *Piper eriopodon* (Figura 2) fueron recolectadas en Mogambo sendero ambiental, vereda Brasil, ubicada en Viotá, Cundinamarca Finca Dinamarca, (Coordenadas: Latitud 4° 24' 36", Longitud 74° 28' 54", Altitud 1200 m.s.n.m), se recogieron cerca de 5 kg de material vegetal. El material fue recolectado en septiembre de 2016.



Figura 2. *Piper eriopodon*

El material botánico fue identificado, autenticado y llevado por el Instituto de Ciencias naturales Herbario Nacional colombiano, bajo el número de colección COL592067 y determinada por O. Rivera -Diaz /2016. **(6. ANALISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO**

6.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Para evaluar la actividad antifúngica de AEPE se midieron los 4 halos de inhibición de cada cultivo, obteniendo un promedio a diferentes gradientes de concentración del AEPE frente a las cepas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. (Tabla 5) Estos resultados demuestran el potencial efecto antifúngico

Tabla 5 Promedio de halos de Inhibición de crecimiento de las cepas al exponerse al AEPE

PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICION (mm)		
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
AEPE 5 μL	9,245	16,325
AEPE 15 μL	11,827	17,205

Al evaluar el porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Piper eriopodon* frente a la cepa de *Trichophyton rubrum* a diferentes gradientes de concentración, se

evidencia que a mayor gradiente de volumen de AEPE mayor inhibición del crecimiento (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

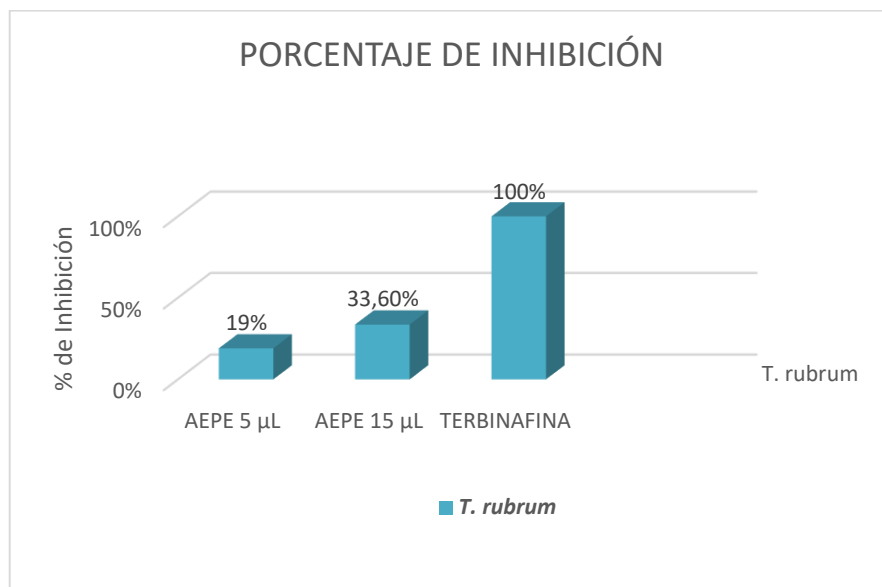


Figura 12 Porcentaje de inhibición de AEPE frente a *T. rubrum*

6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DETERMINADA POR CG-EM

La información de la CG-EM del aceite esencial de *Piper eripodon* que por comparación presentan más de un 90 % de coincidencia con el espectro de la librería NIST 08 (37) y los porcentajes de abundancia de cada componente dentro del aceite esencial.

En el aceite esencial fueron identificados 24 metabolitos secundarios con más del 90% de coincidencia, en la Figura 13 se puede apreciar la distribución de los metabolitos de mayor a menor.

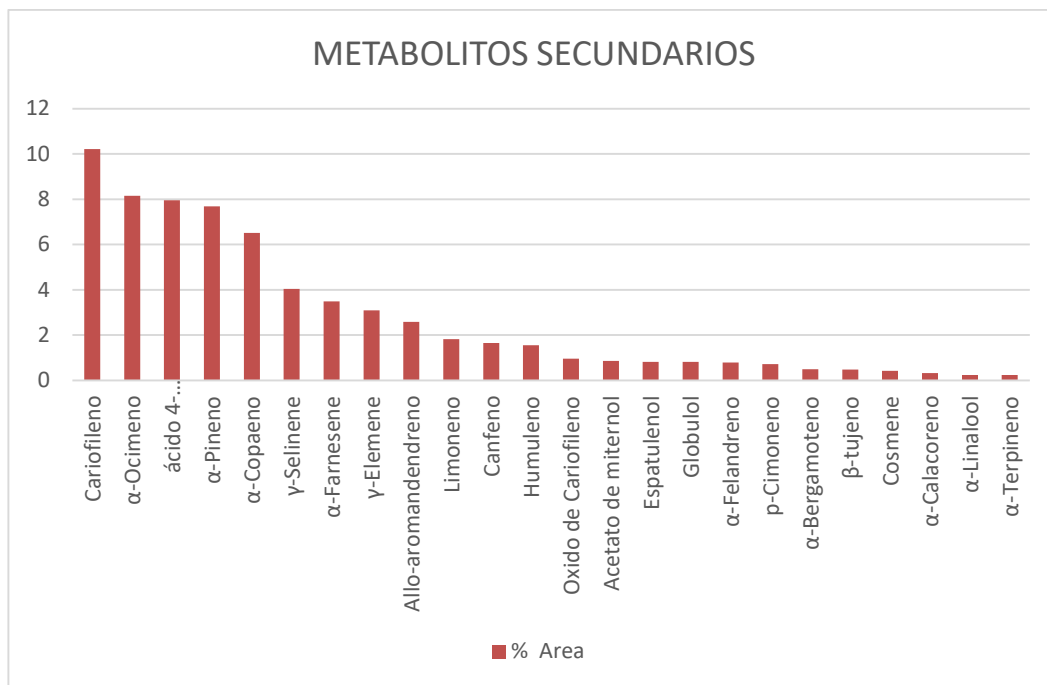


Figura 13 Metabolitos secundarios con Mayor % de área y que presentan un % de coincidencia mayor 90 AEPE

En cuanto a la distribución de los metabolitos secundarios basados en el estudio se encontró que de 24 metabolitos secundarios aislados del AEPE, 12 fueron sesquiterpenos, 10 monoterpenos, 1 ácido fenólico y 1 furanocumarina.

NOMBRE COMPUESTO	CLASE
Cariofileno	Sesquiterpenoide
α -Ocimeno	Monoterpenoide
ácido 4-hidroxifenilacético	Acido fenolico
α -Pinenos	Sesquiterpenoide
α -Copaeno	Sesquiterpenoide
γ -Selinene	Sesquiterpenoide
α -Farnesene	Sesquiterpenoide
γ -Elemene	Monoterpenoide
Allo-aromandendreno	Monoterpenoide
Limoneno	Monoterpenoide
Canfeno	Sesquiterpenoide
Humuleno	Sesquiterpenoide
Oxido de Cariofileno	Sesquiterpenoide
Acetato de miternol	Monoterpenoide
Espatuleno	Sesquiterpenoide
Globulol	Sesquiterpenoide
α -Felandreno	Sesquiterpenoide
p-Cimoneno	Monoterpenoide
α -Bergamoteno	Furanocumarina
β -tujeno	Monoterpenoide
Cosmene	Monoterpenoide
α -Calacoreno	Sesquiterpenoide
α -Linalool	Monoterpenoide
α -Terpineno	Monoterpenoide

Tabla 6 Clase de metabolitos secundarios aislados AEPE

A continuación, se muestra los espectros de masa de los monoterpenos identificados en el aceite esencial de *Piper eriopodn*.

7. DISCUSION

Este estudio permitió demostrar que el aceite esencial de las hojas de *Piper eriopodon* tienen actividad antifúngica in vitro contra las sepas *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Al evaluar el porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Piper eriopodon* frente a la cepa de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a diferentes gradientes de concentración, se demostró que a mayor gradiente de volumen de AEPE mayor inhibición del crecimiento.

La potencial actividad antifúngica encontrada en este estudio del aceite esencial de *Piper eriopodon* puede ser corroborada con la evidencia de otras especies distribuidas en América Latina de la familia Piperáceae, que poseen resultados positivos frente a microorganismos del género *Trichophyton* especialmente con la especie *Piper aduncun* donde se ha evidenciado la actividad antifúngica que poseen sus hojas; al realizar un análisis comparativo, los compuestos identificados en *Piper aduncun* son comunes a los aislados por CG-EM de nuestra especie; tal es el caso de algunos monoterpenos como el linalol y sesquiterpenos como α -calacorene, α -cariofileno.(14) (23).

Los monoterpenos son metabolitos secundarios capaces de formar enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas diana y son la causa principal de los efectos antimicrobianos, por lo tanto, la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas *Piper eriopodon*, podría explicarse a partir de los porcentajes de coincidencia de los metabolitos secundarios identificados, en el que el mayor porcentaje lo obtuvo los terpenos tipo sesquiterpenos y monoterpenos.(38)

El cariofileno metabolito secundario presente en muchos aceites esenciales seguro y no toxico, en el AEPE presenta el mayor porcentaje de área y según la literatura tiene un potencial efecto antifúngico en cuadros de onicomicosis (39).

El α -ocimeno metabolito secundario abundante en nuestra muestra, es un monoterpeno que según la literatura se encuentra en varias plantas aromáticas y presenta propiedades antioxidantes.(40)

El α -linalol metabolito secundario de tipo monoterpeno se encuentra en bajas cantidades en nuestra muestra pero ha demostrado tener actividad antifúngica, actuando directamente en la pared de hongos (23).

Existen otros metabolitos reportados en la literatura con actividad antifúngica sé cómo son cariofileno, ocimeno y linalol (23)

Es importante destacar que el aceite de *Piper eriopodon* muestra actividad frente a las cepas de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*; la mayor actividad antifúngica se obtuvo frente al *T. rubrum* con un porcentaje de inhibición 33,6% frente al control positivo; sin embargo otros estudios evidencian que el aceite esencial de *Piper eriopodon* solo posee actividad contra la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*, que difiere de lo hallado en este estudio.(9)

8. CRONOGRAMA

	2016						2017		
	Sep5/Sep9	Sep12/Sep/30	Sep5/Oct7	Oct5/Nov11	Nov1/Nov18	Nov21/Dic14	Ener10/Febr10	mar-01	Mayo6/2017
Problema	X								
Pregunta	X								
Reconocimiento de la especie		X							
Cedula del trabajo		X							
Terminación del anteproyecto			X						
Elaboración del proyecto				X					
Recolección de datos					X				
Análisis de Datos						X			
Resultados							X		
Comunicación de Resultados								X	
Entrega de trabajo									X

9. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el aceite esencial de las hojas de *Piper eripodon* tienen actividad antifúngica in vitro contra las cepas *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, probablemente relacionado con la presencia de monoterpenoides; metabolitos identificados en el aceite por CG-EM y que de acuerdo a la literatura presenta esta actividad antimicótica. Este resultado abre la posibilidad de reproducir estudios de características similares que permitan avanzar hacia fases clínicas con el objetivo de encontrar un fármaco de origen vegetal con potencial efecto antimicótico

La inhibición del crecimiento de las cepas estudiadas es directamente proporcional al volumen de AEPE utilizado

10. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos en este estudio, relacionados con la actividad antimicótica del aceite esencial de *Piper eriopodon*, demostrada in vitro frente a las cepas *Trychophyton rubrum* y *Trychophyton mentagrophytes*, se recomienda sea corroborada la información con estudios semejantes que finalmente permitan avanzar hacia fases clínicas en la búsqueda de una alternativa terapéutica para las dermatofitosis dentro de la farmacología vegetal.

Se recomienda para estudios próximos, el uso de una dosis específica para el aceite esencial de *Piper eriopodon* y el control con terbinafina u otro, que permitan determinar el halo de inhibición en función a la dosis.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Martinez A. ACEITES ESENCIALES. 2003. p. 1–34.
2. SA. MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Tema 8, Tema 9. 2003;2003(grupo 1):1–6. Available from: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema08.pdf>
3. Sanchez L, Matos R, Kumakawa H. Infecciones micóticas superficiales Superficial fungal infections. 2009;19(3):226–66.
4. Com B. Económica alguien fuera del grupo de tratamiento . :1–8.
5. Pitt J, Hodcking A. Fungi and Food spoilage.
6. SA. Microbiología General Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos. :1–15. Available from: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema 03.- Eliminacion y conservacion.pdf>
7. Thomas B. Fitzpatrick. Dermatología En Medicina Genera. In 2009. p. 1200.
8. Hernández-salazar A, Carbajal-pruneda P. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum* . Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. 2007;122–4.
9. Tangarife V, Correa J, Roa V, Pino N, Betancur L, Duran D, et al. Anti-dermatophyte , anti- *Fusarium* and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. 2014;26(3):221–7.
10. Taylor L. tropical plant database : matico [Internet]. 2006. p. 10. Available from: <http://www.rain-tree.com/matico.htm#.WPJ5WVPhBEICita> Estudio fitoquímico y evaluando la actividad de fungicida y eriopodon insecticida como *Piper* (*Piperaceae*)
11. Adam O Goldstein, MD, MPH Beth G Goldstein M. Infeccion por dermatofitos (tiña). UpToDate. 2015;tema 4030:10.
12. E. Amazan, A. Aoun, A. Guillier, E. Baubion GH. micosis superficial. Micosis Superf EMC - Tratado Med 2016. 2016;20:7.
13. Roderick J. Dermatofitosis y otras micosis superficiales. Enfermedades Infec Principios y Práctica. 2002;3333–42.
14. Santos M, Magalhaes C, Barcellos da rosa M, Asis D, Goncalves B, Machado L, et al. La actividad antifúngica de extractos de *Piper aduncum* hojas preparado por diferentes disolventes y técnicas de extracción contra dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale*. 2017;44(4):1–5.
15. Imran Majid , Gousia Sheikh , Farhath Kanth y RH 1. Recaída después de terapia con terbinafina oral en Dermatofitosis: Una clínica y micológica Estudio. Indian J Dermatol [Internet]. 2016;61:5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029239/>
16. Gupta AK 1 CE. actualizacion en terapias antifungica de dermatofitosis. Mycopathologia [Internet]. 2008;166(5):353–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478357?report=docsum>
17. Adam O Goldstein, MD, MPH Neal Bhatia M. Onicomycosis. In: UpToDate [Internet]. 2017. Available from: www.uptodate-com.recursosenlinea.juanncorpas.edu.co:2443/contents/onychomycosis-management/print?source=search_result&search=efectos secundarios de la terbinafina&selectedTitle=5~39.
18. David L. Lentz a,* AMC b, B CDH, C BM-G, D CMP, A JC, A OI, et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1998;63:253–63.
19. Mario Alberto Quijano-Abril RC-P y DRM-E. Las áreas de endemismo y patrones de

- distribución de especies neotropicales Piper (Piperaceae). J Biogeogr [Internet]. 2006;33:1266–78. Available from: <http://www.jstor.org/stable/3838614>
20. Lindsey Marcellin, MD M. tinea infections. Copyr Elsevier- Clin [Internet]. 2013;37. Available from: https://www.clinicalkey.es/#!/content/medical_topic/21-s2.0-1014602
 21. Molina A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. ELSEVIER. 2011;29(3):33–9.
 22. Brinster N, Liu V, Diwan A. Dermatophytosis. ClinicalKey. 2011;
 23. Correa Y, Palomino, Lady, Marino O. Actividad antioxidante y antifúngica de piperaceae de la flora colombiana. Rev Cuba Plantas Med. 2015;20(2).
 24. Lizarazo J, Muñoz D, Diaz L. ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MADERA DE Piper eriopodon(Piperaceae). Cienc Desarro E Innov. 2015;
 25. Calle J. CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA PIPERACEAE.
 26. Ávalos A, Elena G. Metabolismo secundario de plantas. Reduca Biol Ser Fisiol Veg. 2009;2(3):119–45.
 27. Palá J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “Eryngium” L, en la Península Ibérica. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS; 2002.
 28. Johana Gallegos. ESTUDIO DE LAS EMISIONES DE TERPENOS POR LA ESPECIE NATIVA Schinus molle L . (Pimiento), SUS VARIACIONES TEMPORALES Y SU CONTRIBUCIÓN AL. 2013;
 29. Trudy Mckee JRM. Bioquímica (las bases moleculares de la vida). Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013. 1689-1699 p.
 30. Moreno J. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía Bogotá, Colombia 2011 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE Piper eriopodon y Zanthoxylum monophyllum Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS SOBRE DOS HONGOS FITOPATÓGENOS DE CLAVEL . 2011;159.
 31. Alessandrini Díaz M. Buenas prácticas con las plantas medicinales en comunidades de la Amazonía ecuatoriana: una experiencia en la fusión del conocimiento ancestral y el conocimiento científico. Editorial Universitaria, editor. 2011. 157 p.
 32. Perdomo, Duberney. Palomares B. Extracción y evaluación de rendimientos de los aceites esenciales del árbol Aniba Perutilis Hemsley (Comino) mediante el método de arrastre con vapor. 2015.
 33. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Cuarta. Adams RP, editor. USA; 2007. 804 p.
 34. Bernal R. M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. Biomédica [Internet]. 1984;4(3–4):112. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
 35. Torres-rodríguez JM, Madrenys-brunet N, Urrea- A. Terbinafina por vía oral en el trata- miento de la tinea unguium de los pies . Eficacia entre 12 y 24 semanas de tratamiento. 1998;160–2.
 36. Corzo Barrag?n DC. Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract of Cestrum buxifolium Kunth | Evaluaci?n de la actividad antimicrobiana del extracto etan?lico. Rev Mex Ciencias Farm. 2012;43(3).
 37. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. J Mass Spectrom. 2010;45(7):703–14.

38. Mohr FBM, Lermen C, Gazim ZC, Gonçalves JE, Alberton O. Antifungal activity, yield, and composition of ocimum gratissimum essential oil. *Genet Mol Res.* 2017;16(1).
39. Yang D, Michel L, Chaumont JP, Millet-Clerc J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia.* 1999;148(2):79–82.
40. Reuss G, Disteldorf W, Gamer AO, Hilt A. Formaldehyde. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 2012;15:735–68.

12. ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 391
Bogotá D.C., 28 de septiembre de 2016

Señores
Libia Orozco
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica.

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

☞ Nombre: *Piper eriopodon* (Miq.) C. DC.
☞ Familia: PIPERACEAE
No. COL 592067
Colector Luis Enrique Acero Duarte
No. Colecta 1
Determinó O. Rivera-Díaz/2016

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano -COL
Universidad Nacional de Colombia
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copia: Archivo COL
Herbario

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 - 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Anexo 1.Certificado)

4.2.2. Obtención aceite esencial



Figura 3, Obtención de aceite

El aceite esencial fue obtenido (*Figura 3*) empleando el método de hidrodestilación en un equipo Clevenger modificado durante cuatro horas de extracción.



Figura 4. Hidrodestilación Clevenger modificado

La hidrodestilación (*Figura 4*) es un procedimiento que se emplea para la separación de compuestos volátiles en material vegetal de tipo aromático.

El material botánico es sumergido en agua y se deja hervir por un determinado tiempo, los componentes volátiles colectados pueden ser separados por medio de una trampa tipo clevenger, el vapor producido arrastra los aceites esenciales hasta un recipiente donde finamente se condensan y se separan, esta técnica tiene como

ventaja, el bajo costo para la fabricación y montaje del equipo, pero como desventaja algunos compuestos pueden ser susceptibles a hidrólisis y la extracción del aceite esencial puede ser incompleta.(31)

El porcentaje de rendimiento del aceite se calculó mediante la Fórmula 1.(32). La densidad del aceite esencial fue calculada mediante la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

$$\% \text{ Rendimiento Aceite esencial: } \frac{\text{Peso obtenido del aceite esencial}}{\text{Peso del material vegetal}} \times 100$$

Fórmula 1.Rendimiento

$$\text{Densidad: } \frac{\text{Masa}}{\text{Volumen}} = \frac{0,0421 \text{ g}}{0,05 \text{ mL}} = 0,842 \text{ g/mL}$$

Fórmula 2. Densidad

4.2.3. Determinación de la composición química CG.EM

La determinación de la composición química del aceite esencial se realizó CG-EM en un equipo Thermo Trace 1300 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ LT con cuádruplo sencillo como analizador. Para el análisis se utilizó una columna Rxi® 5Sil MS de 60 m, 0.25 mm ID y 0.25 µm df (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano). Se implementó un programa de temperatura empezando en 120 °C manteniéndose durante 2 min, luego se aplicó una rampa de 6 °C/min hasta llegar a 300°C manteniéndose durante 10 min; el volumen de inyección fue 1µL en modo Split, con un flujo de 1mL/min y una relación de Split de 10. La forma de ionización fue impacto electrónico (E.I) a 70 eV.

Los índices de retención (IR) se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos, analizados bajo las mismas condiciones del aceite esencial.

La identificación de los componentes del AEPE por CG-EM se realizó comparando los índices de retención y los espectros de masa con datos reportados en la literatura (33).

4.2.4. Evaluación de la actividad antifúngica

Para evaluar la actividad antifúngica se utilizaron cepas ATCC (American Type Culture Collection), las especies estudiadas fueron *Trichophyton rubrum* ATCC28188, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533. El cultivo celular de cada

uno de los microorganismos se preparó inoculando cada una de las cepas ATCC, por siembra masiva en una caja de Petri con Agar Trypticasa de Soya, Se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. por 72 horas. Se verifico su crecimiento.

Se diluyo el cultivo en agua peptonada, hasta obtener una turbidez equivalente al estándar número 1 de la escala Mc Farland que equivale a $3,0 \times 10^8$ UFC/mL.(34) Se sembró uniformemente sobre el medio en este caso Agar Mueller Hinton, medio ideal recomendado a nivel internacional para realizar las pruebas de sensibilidad a los microorganismos, se debe dejar secar el sembrado de 5 a 20 minutos manteniendo la caja de Petri sellada.

Posteriormente se colocaron los Sensidiscos blancos previamente impregnados con el aceite esencial de *Piper eripodon* (Figura 5) en cada una de las cepas sembradas y a diferente gradiente. También se realiza la impregnación de los Sensidiscos con el control positivo (terbinafina a una concentración de $30 \mu\text{g/mL}$) en cada una de las cepas.

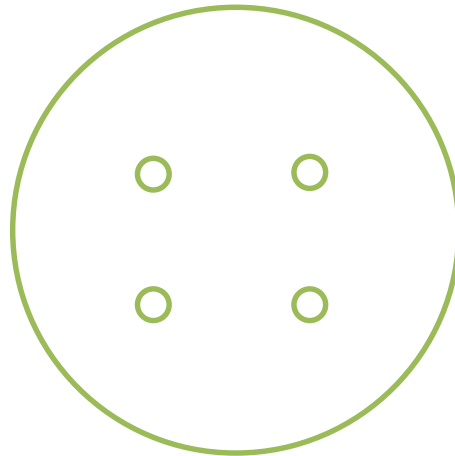


Figura 5. Patrón de distribución discos

Seguidamente las cajas se incubaron y después de 24 horas se realizó la lectura de las mismas, una vez hecha la medición se comparó la actividad antimicótica del AEPE con el fármaco de síntesis química (Control Positivo), en este caso se eligió la terbinafina, medicamento eficaz en el tratamiento de dermatofitosis por *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* (35) ; lo que garantiza objetividad en la medición real de actividad antimicótica.

Para evaluar la actividad antifúngica frente al aceite esencial de *Piper eripodon* (AEPE), se realizó la medición del halo de inhibición del crecimiento de las dos cepas: *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533; este halo se halló midiendo el diámetro que se forma alrededor de cada uno de los Sensidiscos del cultivo como muestra la (Figura 6).

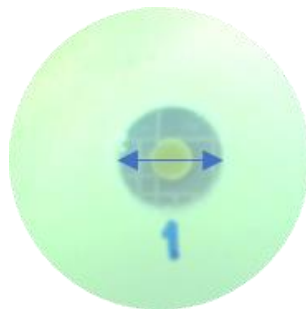


Figura 6. Muestra cómo medir el halo de inhibición

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula 3, teniendo como referencia, la medida del diámetro del halo de inhibición del control positivo y del aceite esencial.(36)

$$\% \text{ Inhibición: } \frac{\text{Halo del aceite esencial}}{\text{Halo del control positivo}} \times 100$$

Fórmula 3. Porcentaje de inhibición

5. DESARROLLO DEL PROYECTO

5.1 RESULTADOS DE OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial de hojas de *Piper eriopodon* fue obtenido como un líquido ligeramente amarillo, con una densidad de 0,854g/mL y un porcentaje de rendimiento de 0,683 %(m/v); la cantidad lograda fueron 8 mL utilizando 1000 gramos de hojas frescas de *Piper eriopodon*.

5.2 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ANTIFÚNGICA

Se obtuvo el crecimiento de cada una de las cepas ATCC después de 72 horas de incubación (Figura 7).

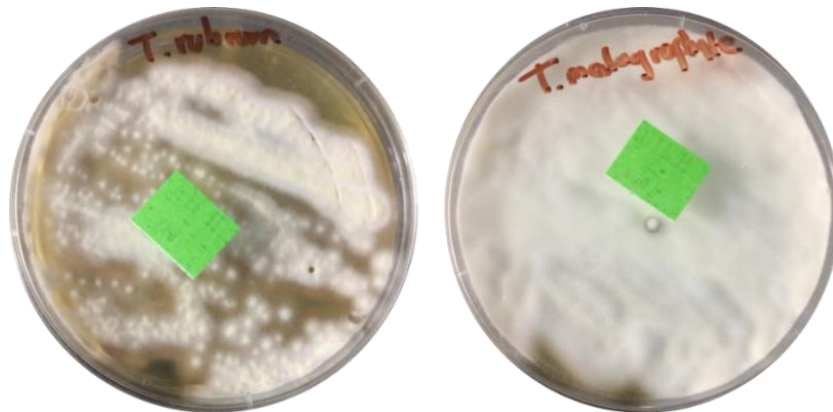


Figura 7 A la izquierda *T. rubrum* ATCC 28188, A la derecha *T. mentagrophytes* ATCC 9533

A continuación, se aprecia el halo de inhibición del AEPE frente a *Trichophyton rubrum* (Figura 8) y *Trichophyton mentagrophytes* (Figura 9).

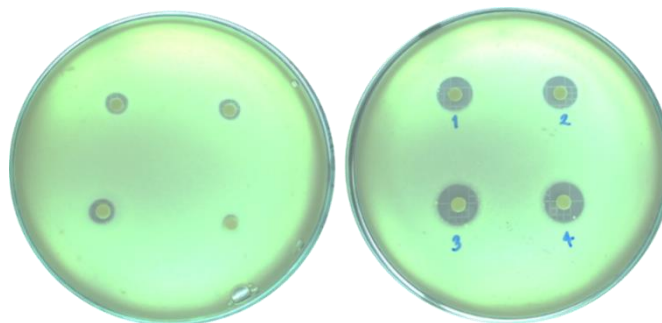


Figura 8. Inhibición del crecimiento de *T. rubrum* con el aceite esencial de *P. eriopodon*. A la izquierda con aceite esencia a 5 µL. A la derecha con aceite esencial 15 µL

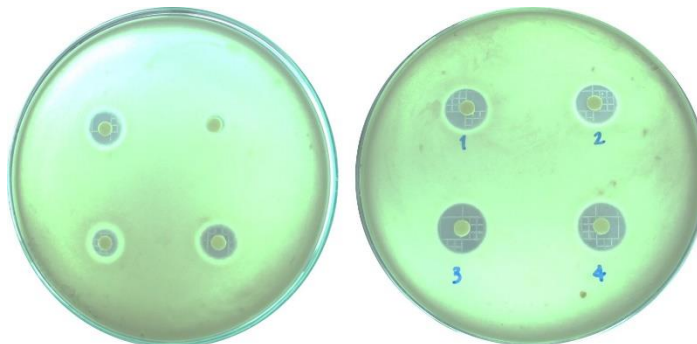


Figura 9 Inhibición del crecimiento de *T. mentagrophytes* con el aceite esencial de *P. eriopodon*. A la izquierda con aceite esencia a 5 µL. A la derecha con aceite esencial 15 µL

En las (Figura 11 y Figura 11) se observa el halo de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas, comparando el aceite esencial de *Piper eriopodon* con el control positivo (terbinafina a una concentración de 30 µg/mL).



Figura 10. Inhibición del crecimiento de *T. rubrum*.

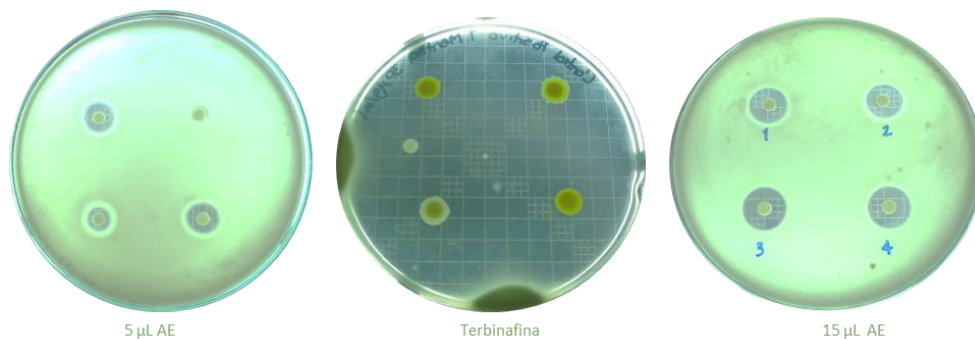


Figura 11. Inhibición del crecimiento de *T. mentagrophytes*

El porcentaje de inhibición de las diferentes cepas frente a la exposición del aceite esencial de *P. eriopodon* se observa en la Tabla 1 con un gradiente de volumen de 5 µg y en la

Tabla 2 con un gradiente de volumen de 15 µg. Teniendo como referencia estos resultados se calculó el porcentaje de inhibición que se observa en la

Tabla 3

Tabla 1 Resultados de los diámetros obtenidos al exponer por 24 horas cada cepa a 5 µg de AEPE

RESULTADO DE HALOS DE INHIBICION CON AEPE A 5µg/mL					
Microorganismo	Halos (mm)				Promedio
<i>T. rubrum</i>	10,76	9,49	10,23	6,5	9,245
<i>T. mentagrophytes</i>	11,85	14,45	13,62	7,39	11,8275

Tabla 2 Resultados de los diámetros obtenidos al exponer por 24 horas cada cepa a 15 µg de AEPE

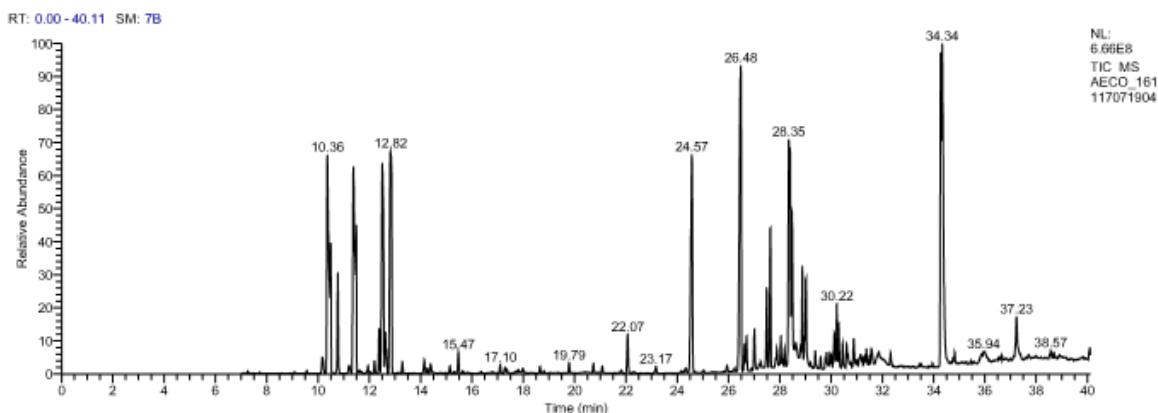
RESULTADO DE HALOS DE INHIBICION CON AEPE A 15µg/mL					
Microorganismo	Halos (mm)				Promedio
<i>T. rubrum</i>	15,78	15,93	16,59	17	16,325
<i>T. mentagrophytes</i>	17,78	16,37	17,58	17,09	17,205

Tabla 3 Porcentaje de inhibición de aceite esencial de *Piper eripodon* con respecto al control para la cepa de *Trichophyton rubrum*

PORCENTAJE INHIBICION CON ACEITE ESENCIAL DE <i>Piper eripodon</i>												
Microorganismo	Halos (mm)				Promedio	%INHIBICION	Control *	Halos (mm)				Promedio
<i>T. rubrum</i> con AEPE a 5 µL	10,76	9,49	10,23	6,5	9,245	19,0353632	Terbinafina 30µg/mL	48,9	49,09	49,18	47,1	48,5675
<i>T. rubrum</i> con AEPE a 15 µL	15,78	15,93	16,59	17	16,325	33,6130128		48,9	49,09	49,18	47,1	48,5675

5.3 RESULTADOS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE AEPE CG-EM

En la Grafica 1 se evidencia el cromatograma de metabolitos secundarios del AEPE.



Grafica 1 Cromatograma de Metabolitos Secundarios del AEPE

En la Tabla 4 se encuentran la información de la CG-EM del aceite esencial de *Piper eripodon* que por comparación presentan más de un 90 % de coincidencia con él y los porcentajes de abundancia de cada componente dentro del aceite esencial.

Tabla 4 Composición química del aceite esencial de Piper eriopodon

NOMBRE IUPAC	NOMBRE COMPUESTO	TIEMPO RETENCION	% COINCIDENCIA	% AREA
4,11,11-trimethyl-8-methylene-bicyclo[7.2.0]	Cariofileno	26,48	92	10,22
1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-	α -Ocimeno	12,83	92,2	8,16
4-Hydroxyphenylacetic acid	ácido 4-hidroxifenilacético	34,34	97,7	7,96
(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept	α -Pinoeno	10,36	91,1	7,69
(1R,2S,6S,7S,8S)-8-isopropyl-1,3-dimethyltricyclo[4.4.0.0.2,7]	α -Copaeno	24,57	94,2	6,51
Eudesma-4(14),11-diene	γ -Selineno	28,35	91,9	4,04
Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)	α -Farneseno	28,4	90,7	3,49
Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)	γ -Elemeno	28,48	91,2	3,1
Alloaromadendrene	Allo-aromadendreno	27,63	92,5	2,58
p-Mentha-1(7),3-diene	Limoneno	11,49	90,6	1,82
2,2-dimetil-3-metilen-biciclo[2.2.1]heptano	Canfeno	10,77	93	1,65
2,6,6,9-Tetramethyl-1,4-8-cycloundecatriene	Humuleno	27,49	92,3	1,56
(1R,4R,6R,10S)-4,12,12-trimetil-9-metilen-5-oxatriciclo[8.2.0.0]dodecano	Oxido de Cariofileno	30,22	92,2	0,96
2-Pinen-10-ol, acetate	Acetato de miternol	22,07	94,4	0,86
1H-Cycloprop[e]azuleno, decahidro-1,1,7-trimethyl-4-methylene	Espatuleno	27,01	92,1	0,82
1,1,4,7-tetramethyl-2,3,4a,5,6,7,7a,7b-octahidro-1aH-cyclopropa[e]azulen-4-ol	Globulol	30,29	92	0,82
2-Methyl-5-(1-methylethyl)-1,3-cyclohexadiene	α -Felandreno	12,63	93,5	0,79
Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	p-Cimoneno	12,38	93,2	0,72
Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)	α -Bergamoteno	26,63	92,1	0,49
Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	β -tujeno	10,17	92,6	0,48
2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraeno, E,E	Cosmeno	15,47	92,6	0,43
(1S)-4,7-dimethyl-1-propan-2-yl-1,2-dihidronaftaleno	α -Calacoreno	29,39	95,3	0,32
1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	α -Linalool	14,39	91,6	0,24
1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	α -Terpineno	12,2	91,1	0,24

6. ANALISIS DEL DESARROLLO DEL PROYECTO

6.1 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Para evaluar la actividad antifúngica de AEPE se midieron los 4 halos de inhibición de cada cultivo, obteniendo un promedio a diferentes gradientes de concentración del AEPE frente a las cepas de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. (Tabla 5) Estos resultados demuestran el potencial efecto antifúngico

Tabla 5 Promedio de halos de Inhibición de crecimiento de las cepas al exponerse al AEPE

PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICION (mm)		
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>

AEPE 5 μ L	9,245	16,325
AEPE 15 μ L	11,827	17,205

Al evaluar el porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Piper eriopodon* frente a la cepa de *Trichophyton rubrum* a diferentes gradientes de concentración, se evidencia que a mayor gradiente de volumen de AEPE mayor inhibición del crecimiento (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

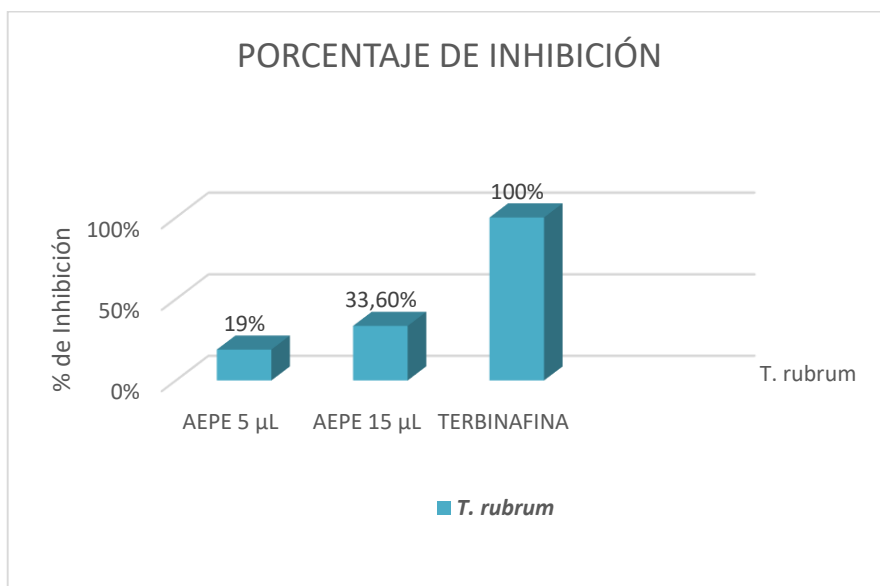


Figura 12 Porcentaje de inhibición de AEPE frente a *T. rubrum*

6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DETERMINADA POR CG-EM

La información de la CG-EM del aceite esencial de *Piper eriopodon* que por comparación presentan más de un 90 % de coincidencia con el espectro de la librería NIST 08 (37) y los porcentajes de abundancia de cada componente dentro del aceite esencial.

En el aceite esencial fueron identificados 24 metabolitos secundarios con más del 90% de coincidencia, en la Figura 13 se puede apreciar la distribución de los metabolitos de mayor a menor.

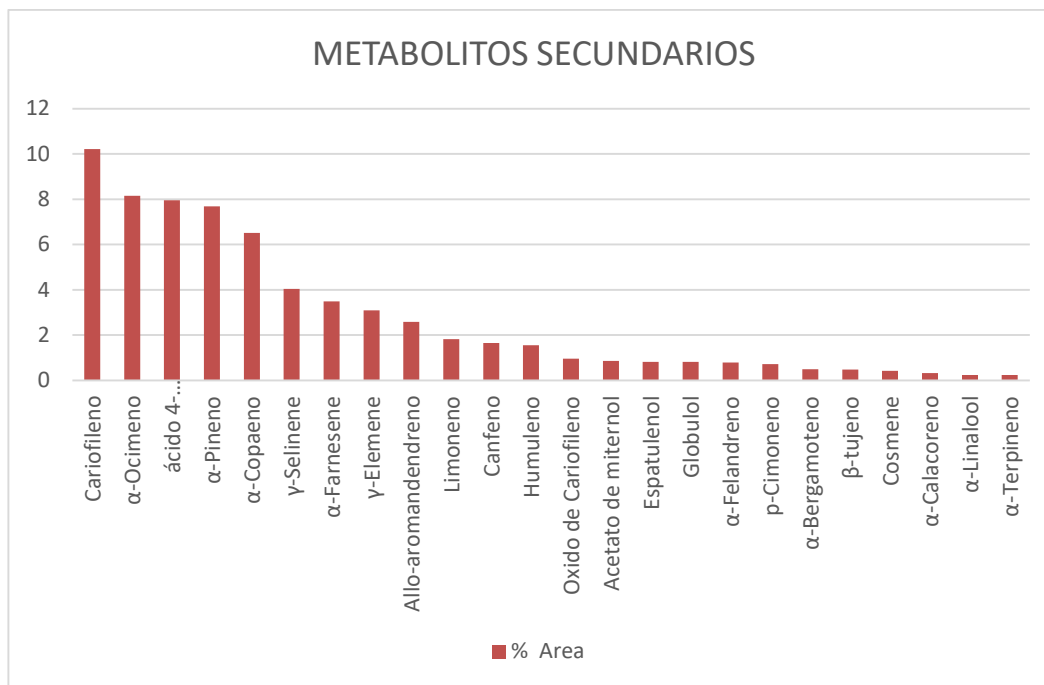


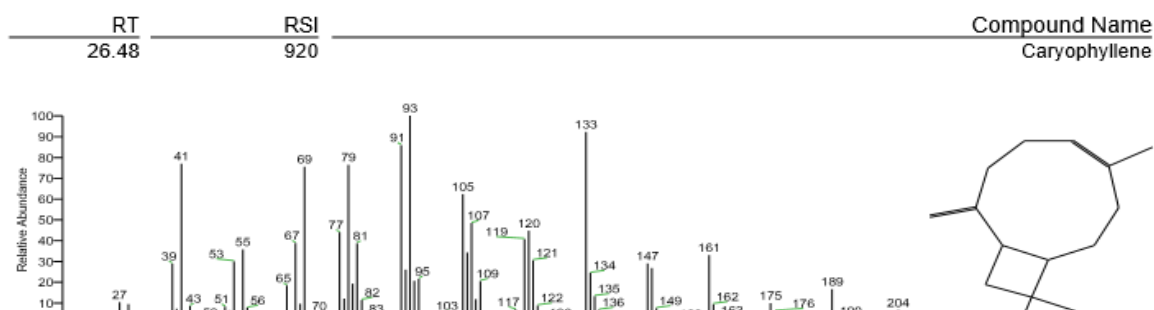
Figura 13 Metabolitos secundarios con Mayor % de área y que presentan un % de coincidencia mayor 90 AEPE

En cuanto a la distribución de los metabolitos secundarios basados en el estudio se encontró que de 24 metabolitos secundarios aislados del AEPE, 12 fueron sesquiterpenos, 10 monoterpenos, 1 ácido fenólico y 1 furanocumarina.

NOMBRE COMPUESTO	CLASE
Cariofileno	Sesquiterpenoide
α -Ocimeno	Monoterpenoide
ácido 4-hidroxifenilacético	Acido fenolico
α -Pinoeno	Sesquiterpenoide
α -Copaeno	Sesquiterpenoide
γ -Selinene	Sesquiterpenoide
α -Farnesene	Sesquiterpenoide
γ -Elemene	Monoterpenoide
Allo-aromandendreno	Monoterpenoide
Limoneno	Monoterpenoide
Canfeno	Sesquiterpenoide
Humuleno	Sesquiterpenoide
Oxido de Cariofileno	Sesquiterpenoide
Acetato de miternol	Monoterpenoide
Espatuleno	Sesquiterpenoide
Globulol	Sesquiterpenoide
α -Felandreno	Sesquiterpenoide
p-Cimoneno	Monoterpenoide
α -Bergamoteno	Furanocumarina
β -tujeno	Monoterpenoide
Cosmene	Monoterpenoide
α -Calacoreno	Sesquiterpenoide
α -Linalool	Monoterpenoide
α -Terpineno	Monoterpenoide

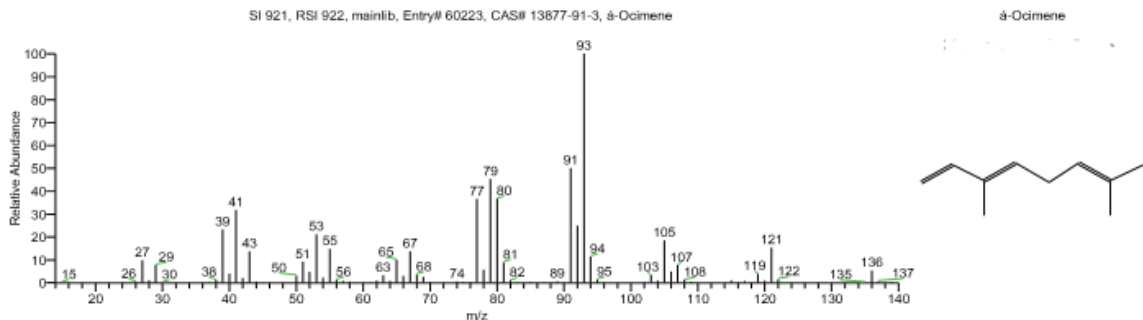
Tabla 6 Clase de metabolitos secundarios aislados AEPE

A continuación, se muestra los espectros de masa de los monoterpenos identificados en el aceite esencial de *Piper eriopodon*.



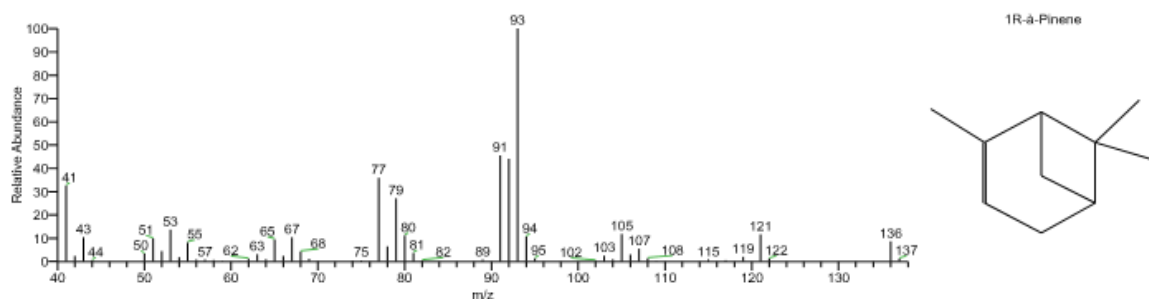
Grafica 2 Cromatograma de Caryophyllene

RT	RSI	Compound Name
12.83	922	á-Ocimene



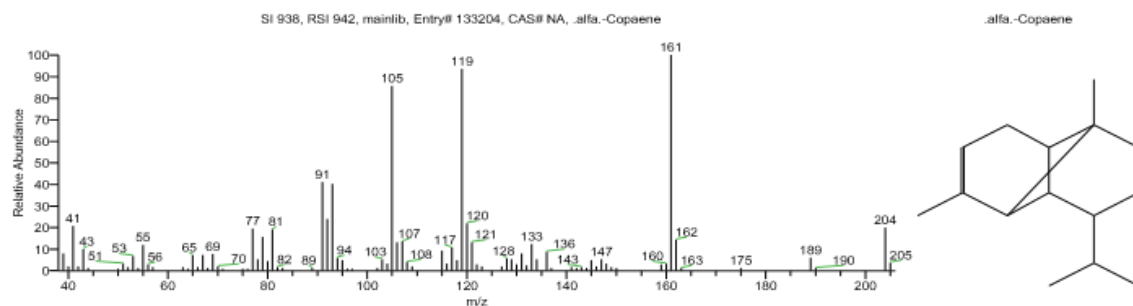
Grafica 3 Cromatograma de α-Ocimene

RT	RSI	Compound Name
10.36	911	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene

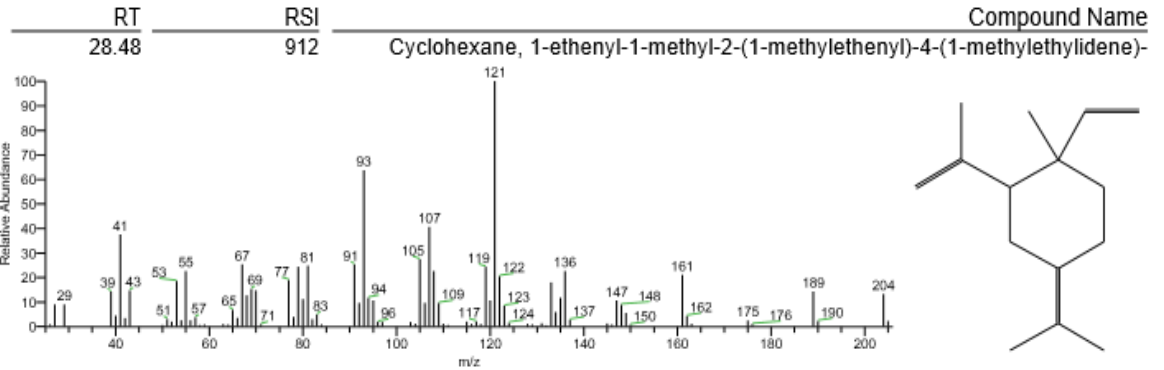


Grafica 4 Cromatograma de α-Pineno

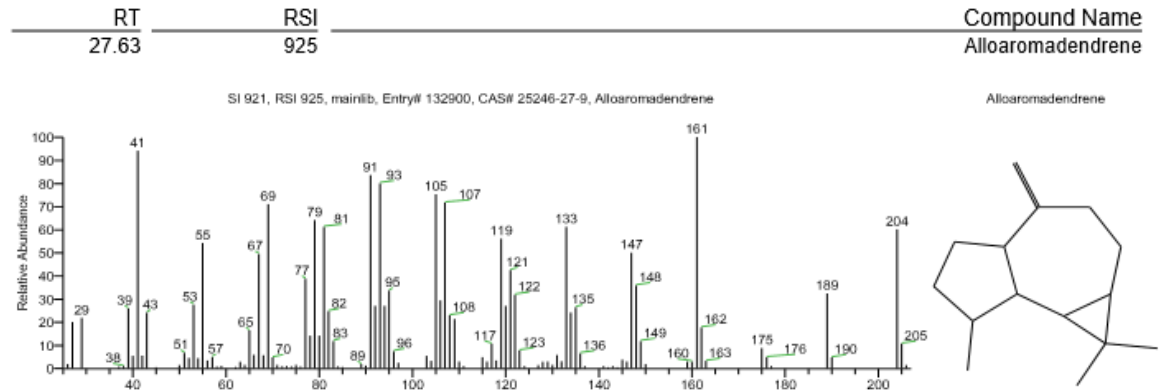
RT	RSI	Compound Name
24.57	942	α-Copaene



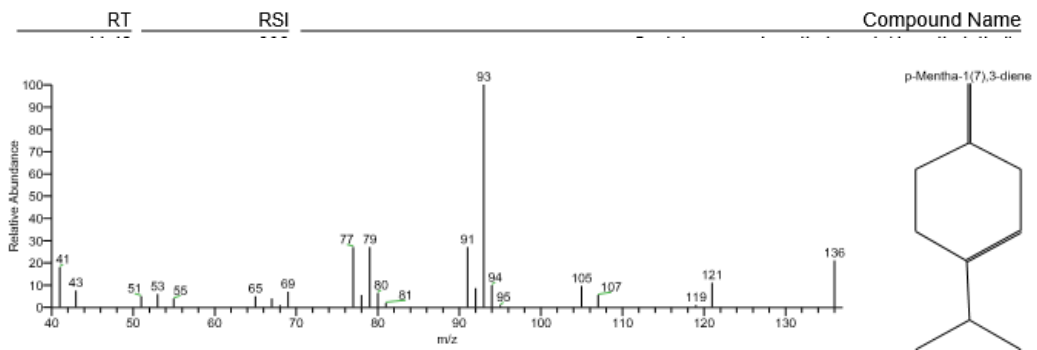
Grafica 5 Cromatograma de α-Copaene



Grafica 6 Cromatograma de y-elemene

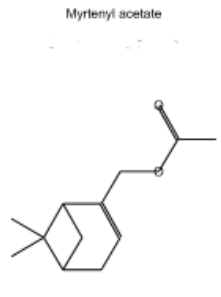
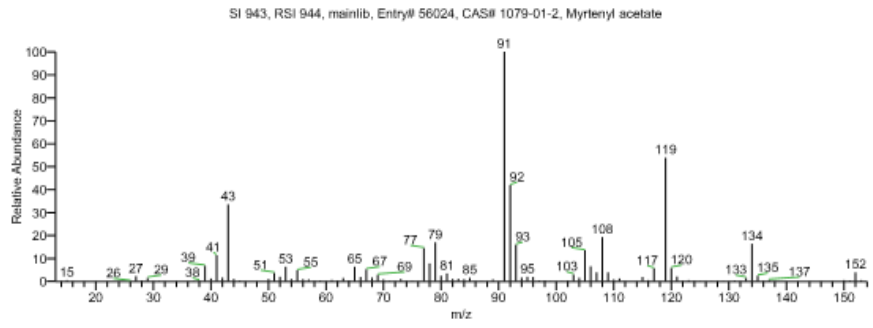


Grafica 7 Cromatograma de alloaromadendrene



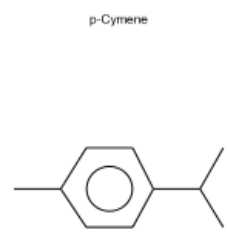
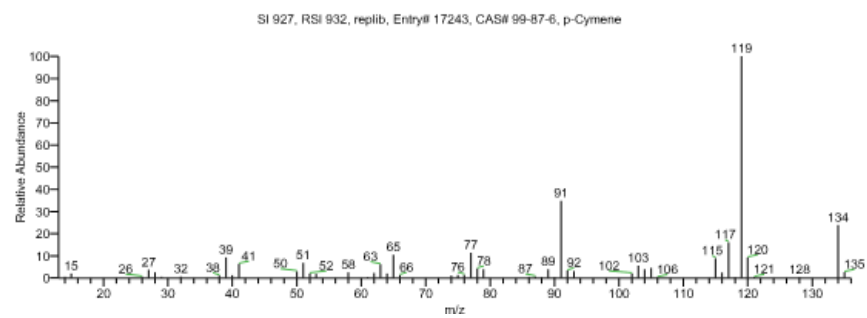
Grafica 8 Cromatograma de Limoneno

RT	RSI	Compound Name
22.07	944	Myrtenyl acetate



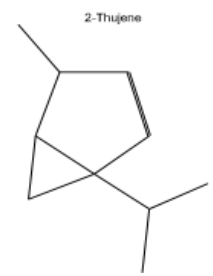
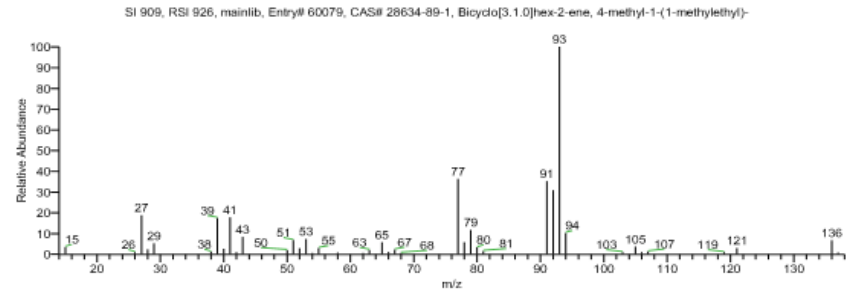
Grafica 9 Cromatograma de Acetato de miternol

RT	RSI	Compound Name
12.38	932	p-Cymene



Grafica 10 Cromatograma de p-Cimoneno

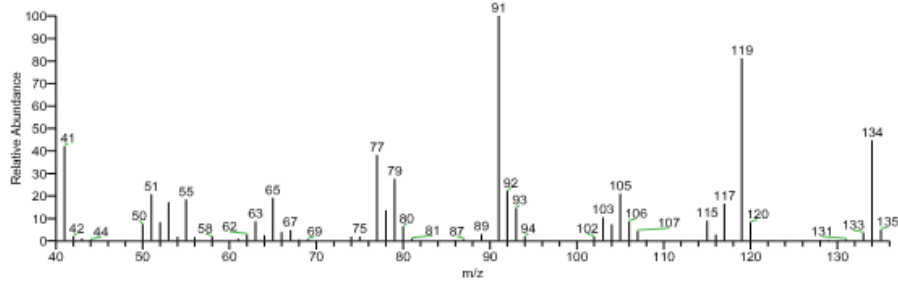
RT	RSI	Compound Name
10.17	926	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-



Grafica 11 Cromatograma de B-tujeno

RT	RSI	Compound Name
15.47	926	2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-

SI 911, RSI 921, mainlib, Entry# 56050, CAS# 460-01-5, 2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene, E,E-

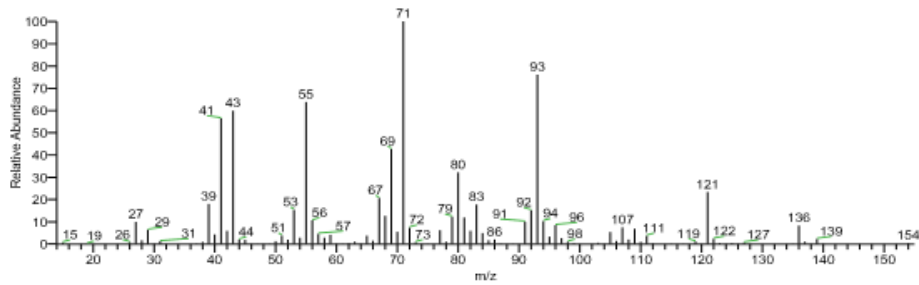


Grafica 12 Cromatograma de Cosmene

RT	RSI	Compound Name
14.39	916	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-

SI 912, RSI 916, NISTDEMO, Entry# 1063, CAS# 78-70-6, 1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-

1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-



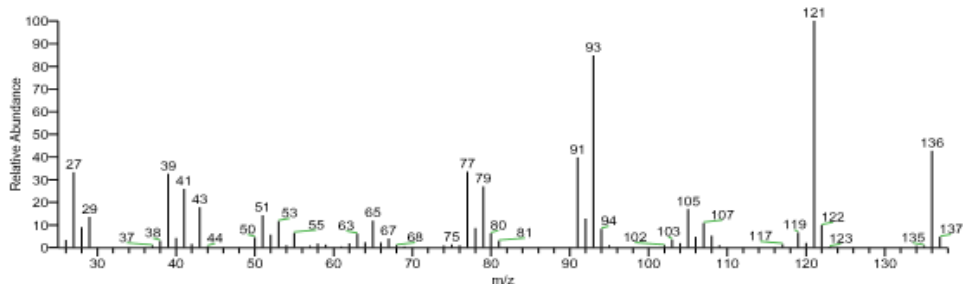
α-Linalool



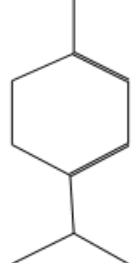
Grafica 13 Cromatograma de α-Linolol

RT	RSI	Compound Name
12.20	911	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-

SI 896, RSI 911, NISTDEMO, Entry# 252, CAS# 99-86-5, 1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-



α-Terpinen



Grafica 14 Cromatograma de α-terpineno

7. DISCUSION

Este estudio permitió demostrar que el aceite esencial de las hojas de *Piper eriopodon* tienen actividad antifúngica in vitro contra las sepas *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Al evaluar el porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Piper eriopodon* frente a la cepa de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* a diferentes gradientes de concentración, se demostró que a mayor gradiente de volumen de AEPE mayor inhibición del crecimiento.

La potencial actividad antifúngica encontrada en este estudio del aceite esencial de *Piper eriopodon* puede ser corroborada con la evidencia de otras especies distribuidas en América Latina de la familia Piperáceae, que poseen resultados positivos frente a microorganismos del genero *Trichophyton* especialmente con la especie *Piper aduncun* donde se ha evidenciado la actividad antifúngica que poseen sus hojas; al realizar un análisis comparativo, los compuestos identificados en *Piper aduncun* son comunes a los aislados por CG-EM de nuestra especie; tal es el caso de algunos monoterpenos como el linalol y sesquiterpenos como α -calacorene, α -cariofileno.(14) (23).

Los monoterpenos son metabolitos secundarios capaces de formar enlaces de hidrógeno con los sitios activos de las enzimas diana y son la causa principal de los efectos antimicrobianos, por lo tanto, la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas *Piper eriopodon*, podría explicarse a partir de los porcentajes de coincidencia de los metabolitos secundarios identificados, en el que el mayor porcentaje lo obtuvo los terpenos tipo sesquiterpenos y monoterpenos.(38)

El cariofileno metabolito secundario presente en muchos aceites esenciales seguro y no toxico, en el AEPE presenta el mayor porcentaje de área y según la literatura tiene un potencial efecto antifúngico en cuadros de onicomiosis (39).

El α -ocimeno metabolito secundario abundante en nuestra muestra, es un monoterpeno que según la literatura se encuentra en varias plantas aromáticas y presenta propiedades antioxidantes.(40)

El α -linalol metabolito secundario de tipo monoterpeno se encuentra en bajas cantidades en nuestra muestra pero ha demostrado tener actividad antifúngica, actuando directamente en la pared de hongos (23).

Existen otros metabolitos reportados en la literatura con actividad antifúngica sé cómo son cariofileno, ocimeno y linalol (23)

Es importante destacar que el aceite de *Piper eriopodon* muestra actividad frente a las cepas de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*; la mayor actividad antifúngica se obtuvo frente al *T. rubrum* con un porcentaje de inhibición 33,6% frente al control positivo; sin embargo otros estudios evidencian que el aceite esencial de *Piper eriopodon* solo posee actividad contra la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*, que difiere de lo hallado en este estudio.(9)

8. CRONOGRAMA

	2016						2017		
	Sep5/Sep9	Sep12/Sep/30	Sep5/Oct7	Oct5/Nov11	Nov1/Nov18	Nov21/Dic14	Ener10/Febr10	mar-01	Mayo6/2017
Problema	X								
Pregunta	X								
Reconocimiento de la especie		X							
Cedula del trabajo		X							
Terminación del anteproyecto			X						
Elaboración del proyecto				X					
Recolección de datos					X				
Análisis de Datos						X			
Resultados							X		
Comunicación de Resultados								X	
Entrega de trabajo									X

9. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el aceite esencial de las hojas de *Piper eripodon* tienen actividad antifúngica in vitro contra las cepas *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, probablemente relacionado con la presencia de monoterpenoides; metabolitos identificados en el aceite por CG-EM y que de acuerdo a la literatura presenta esta actividad antimicótica. Este resultado abre la posibilidad de reproducir estudios de características similares que permitan avanzar hacia fases clínicas con el objetivo de encontrar un fármaco de origen vegetal con potencial efecto antimicótico

La inhibición del crecimiento de las cepas estudiadas es directamente proporcional al volumen de AEPE utilizado

10. RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta los resultados positivos obtenidos en este estudio, relacionados con la actividad antimicótica del aceite esencial de *Piper eriopodon*, demostrada in vitro frente a las cepas *Trychophyton rubrum* y *Trychophyton mentagrophytes*, se recomienda sea corroborada la información con estudios semejantes que finalmente permitan avanzar hacia fases clínicas en la búsqueda de una alternativa terapéutica para las dermatofitosis dentro de la farmacología vegetal.

Se recomienda para estudios próximos, el uso de una dosis específica para el aceite esencial de *Piper eriopodon* y el control con terbinafina u otro, que permitan determinar el halo de inhibición en función a la dosis.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Martinez A. ACEITES ESENCIALES. 2003. p. 1–34.
2. SA. MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Tema 8, Tema 9. 2003;2003(grupo 1):1–6. Available from: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema08.pdf>
3. Sanchez L, Matos R, Kumakawa H. Infecciones micóticas superficiales Superficial fungal infections. 2009;19(3):226–66.
4. Com B. Económica alguien fuera del grupo de tratamiento . :1–8.
5. Pitt J, Hodcking A. Fungi and Food spoilage.
6. SA. Microbiología General Tema 3.- Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos. :1–15. Available from: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema 03.- Eliminacion y conservacion.pdf>
7. Thomas B. Fitzpatrick. Dermatología En Medicina Genera. In 2009. p. 1200.
8. Hernández-salazar A, Carbajal-pruneda P. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum* . Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. 2007;122–4.
9. Tangarife V, Correa J, Roa V, Pino N, Betancur L, Duran D, et al. Anti-dermatophyte , anti- *Fusarium* and cytotoxic activity of essential oils and plant extracts of *Piper* genus. 2014;26(3):221–7.
10. Taylor L. tropical plant database : matico [Internet]. 2006. p. 10. Available from: <http://www.rain-tree.com/matico.htm#.WPJ5WVPhBEICita> Estudio fitoquímico y evaluando la actividad de fungicida y eriopodon insecticida como *Piper* (*Piperaceae*)
11. Adam O Goldstein, MD, MPH Beth G Goldstein M. Infeccion por dermatofitos (tiña). UpToDate. 2015;tema 4030:10.
12. E. Amazan, A. Aoun, A. Guillier, E. Baubion GH. micosis superficial. Micosis Superf EMC - Tratado Med 2016. 2016;20:7.
13. Roderick J. Dermatofitosis y otras micosis superficiales. Enfermedades Infec Principios y Práctica. 2002;3333–42.
14. Santos M, Magalhaes C, Barcellos da rosa M, Asis D, Goncalves B, Machado L, et al. La actividad antifúngica de extractos de *Piper aduncum* hojas preparado por diferentes disolventes y técnicas de extracción contra dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale*. 2017;44(4):1–5.
15. Imran Majid , Gousia Sheikh , Farhath Kanth y RH 1. Recaída después de terapia con terbinafina oral en Dermatofitosis: Una clínica y micológica Estudio. Indian J Dermatol [Internet]. 2016;61:5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5029239/>
16. Gupta AK 1 CE. actualizacion en terapias antifungica de dermatofitosis. Mycopathologia [Internet]. 2008;166(5):353–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18478357?report=docsum>
17. Adam O Goldstein, MD, MPH Neal Bhatia M. Onicomycosis. In: UpToDate [Internet]. 2017. Available from: www.uptodate-com.recursosenlinea.juanncorpas.edu.co:2443/contents/onychomycosis-management/print?source=search_result&search=efectos secundarios de la terbinafina&selectedTitle=5~39.
18. David L. Lentz a,* AMC b, B CDH, C BM-G, D CMP, A JC, A OI, et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1998;63:253–63.
19. Mario Alberto Quijano-Abril RC-P y DRM-E. Las áreas de endemismo y patrones de

- distribución de especies neotropicales Piper (Piperaceae). J Biogeogr [Internet]. 2006;33:1266–78. Available from: <http://www.jstor.org/stable/3838614>
20. Lindsey Marcellin, MD M. tinea infections. Copyr Elsevier- Clin [Internet]. 2013;37. Available from: https://www.clinicalkey.es/#!/content/medical_topic/21-s2.0-1014602
 21. Molina A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. ELSEVIER. 2011;29(3):33–9.
 22. Brinster N, Liu V, Diwan A. Dermatophytosis. ClinicalKey. 2011;
 23. Correa Y, Palomino, Lady, Marino O. Actividad antioxidante y antifúngica de piperaceae de la flora colombiana. Rev Cuba Plantas Med. 2015;20(2).
 24. Lizarazo J, Muñoz D, Diaz L. ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MADERA DE Piper eriopodon(Piperaceae). Cienc Desarro E Innov. 2015;
 25. Calle J. CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE ALGUNAS ESPECIES DE LA FAMILIA PIPERACEAE.
 26. Ávalos A, Elena G. Metabolismo secundario de plantas. Reduca Biol Ser Fisiol Veg. 2009;2(3):119–45.
 27. Palá J. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género “Eryngium” L, en la Península Ibérica. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS; 2002.
 28. Johana Gallegos. ESTUDIO DE LAS EMISIONES DE TERPENOS POR LA ESPECIE NATIVA Schinus molle L . (Pimiento), SUS VARIACIONES TEMPORALES Y SU CONTRIBUCIÓN AL. 2013;
 29. Trudy Mckee JRM. Bioquímica (las bases moleculares de la vida). Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013. 1689-1699 p.
 30. Moreno J. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía Bogotá, Colombia 2011 ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE Piper eriopodon y Zanthoxylum monophyllum Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS MAYORITARIOS SOBRE DOS HONGOS FITOPATÓGENOS DE CLAVEL . 2011;159.
 31. Alessandrini Díaz M. Buenas prácticas con las plantas medicinales en comunidades de la Amazonía ecuatoriana: una experiencia en la fusión del conocimiento ancestral y el conocimiento científico. Editorial Universitaria, editor. 2011. 157 p.
 32. Perdomo, Duberney. Palomares B. Extracción y evaluación de rendimientos de los aceites esenciales del árbol Aniba Perutilis Hemsley (Comino) mediante el método de arrastre con vapor. 2015.
 33. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Cuarta. Adams RP, editor. USA; 2007. 804 p.
 34. Bernal R. M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. Biomédica [Internet]. 1984;4(3–4):112. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
 35. Torres-rodríguez JM, Madrenys-brunet N, Urrea- A. Terbinafina por vía oral en el trata- miento de la tinea unguium de los pies . Eficacia entre 12 y 24 semanas de tratamiento. 1998;160–2.
 36. Corzo Barrag?n DC. Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract of Cestrum buxifolium Kunth | Evaluaci?n de la actividad antimicrobiana del extracto etan?lico. Rev Mex Ciencias Farm. 2012;43(3).
 37. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, et al. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. J Mass Spectrom. 2010;45(7):703–14.

38. Mohr FBM, Lermen C, Gazim ZC, Gonçalves JE, Alberton O. Antifungal activity, yield, and composition of ocimum gratissimum essential oil. *Genet Mol Res.* 2017;16(1).
39. Yang D, Michel L, Chaumont JP, Millet-Clerc J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia.* 1999;148(2):79–82.
40. Reuss G, Disteldorf W, Gamer AO, Hilt A. Formaldehyde. *Ulmann's Encycl Industrial Chem.* 2012;15:735–68.

12. ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 391

Bogotá D.C., 28 de septiembre de 2016

Señores
Libia Orozco
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica.

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

☞ Nombre: *Piper eriopodon* (Miq.) C. DC.
☞ Familia: PIPERACEAE
No. COL 592067
Colector Luis Enrique Acero Duarte
No. Colecta 1
Determinó O. Rivera-Díaz/2016

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano -COL
Universidad Nacional de Colombia
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copia: Archivo COL
Herbario

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 - 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Anexo 1.Certificado