

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género
Piper y elucidación estructural de sus aceites esenciales**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Silvia Salamanca, Rodriguez
Mauricio Antonio Galiano La Rosa

ASESOR

Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Lima - Perú

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DECANATO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO
Piper Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE SUS ACEITES ESENCIALES”**

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**SILVIA SALAMANCA RODRIGUEZ
MAURICIO ANTONIO GALIANO LA ROSA**

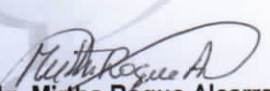
Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:


18 SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 21 de noviembre de 2016.


Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente


Mg. Mirtha Róque Alcarraz
Miembro


Q.F. María Rosario Carreño Quispe
Miembro


Q.F. Walter Rivas Altez
Miembro

“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”



A mis padres, quienes gracias a sus esfuerzos y consejos son responsables de quien soy. Los logros que consiga serán siempre por ustedes, para ustedes y gracias a ustedes.

Silvia Salamanca Rodriguez





A mis padres, quienes han sido mi guía para ser quien soy hoy, por su dedicación, paciencia y amor en su arduo trabajo por hacer de mí una gran persona. Gracias por todo.

Mauricio Antonio Galiano La Rosa



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Alma Mater de nuestra profesión por la formación recibida.

Al Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz, por compartirnos sus amplios conocimientos y experiencia, por su valioso apoyo y orientación sin el cual la culminación de la presente tesis no habría sido posible.

A la QF. Bertha Jurado, por su importante y valiosa asesoría y por su apoyo brindado durante la ejecución de la tesis.

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

INDICE

RESUMEN

SUMMARY

I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general.....	3
1.2	Objetivos específicos	3
1.3	Hipótesis	3
II	GENERALIDADES.....	4
2.1	Familia Piperaceae	4
2.2	Género <i>Piper</i>	5
2.3	Aspectos botánicos de las especies en estudio.....	7
2.3.1	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	7
2.3.2	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	9
2.3.3	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	11
2.3.4	<i>Piper amalago</i> L.	13
2.4	Plantas medicinales	16
2.5	Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.....	17
2.6	Metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos	19
III	PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1	Materiales y equipos.....	23
3.2	Metodología	26
3.2.1	Tipo de estudio	26
3.2.2	Recolección e identificación de las especies.....	26
3.2.3	Extracción de aceites esenciales	27
3.2.4	Análisis preliminar de los aceites esenciales.....	27
3.2.5	Preparación de los extractos.....	28
3.2.6	Marcha fitoquímica preliminar de los extractos	28

3.2.7	Método de difusión en agar.....	28
3.2.8	Método de microdilución	31
3.2.9	Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales.....	37
3.3	Flujograma de trabajo experimental.....	38
IV	RESULTADOS	39
4.1	Análisis preliminar de los aceites esenciales	39
4.2	Marcha fitoquímica preliminar de los extractos.....	40
4.3	Actividad antimicrobiana.....	41
4.3.1	Método de difusión en agar.....	41
4.3.2	CMI por el método de microdilución colorimétrica en microplaca.....	49
4.1	Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales	57
V	DISCUSIÓN	62
VI	CONCLUSIÓN	74
VII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
VIII	ANEXOS	89

RESUMEN

El presente trabajo de investigación de naturaleza descriptiva, transversal y experimental tuvo por finalidad determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales y extractos etanólicos de hojas de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav., *Piper carpunya* Ruiz & Pav., *Piper callosum* Ruiz & Pav. y *Piper amalago* L., recolectadas en los departamentos de Cajamarca, Loreto y Amazonas, y la elucidación estructural de los componentes de sus aceites esenciales. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* cepa ambiental, *Bacillus cereus* cepa alimentaria, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231. Los aceites esenciales de *P. acutifolium* Ruiz & Pav., *P. callosum* Ruiz & Pav. y *P. amalago* L. presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *S. epidermidis* y *B. cereus*, mientras que el extracto etanólico de *P. acutifolium* Ruiz & Pav. mostró actividad frente a *B. subtilis* (halos de inhibición > 18 mm). Por el método de microdilución, los aceites esenciales y los extractos etanólicos mostraron actividad antimicrobiana con una CMI de 0.12 ± 0.06 a 0.26 ± 0.09 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y una CMI de 5.86 ± 2.76 a 145.83 ± 95.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solo frente a las bacterias Gram positivas en estudio. Además todos los aceites esenciales y el extracto etanólico de *P. callosum* Ruiz & Pav. presentaron buena actividad frente a *C. albicans*. La elucidación estructural se realizó mediante Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM) y reveló que los sesquiterpenos fueron los componentes mayoritarios, seguidos de los monoterpenos y fenilpropanoides.

Palabras clave: *Piper acutifolium*, *Piper carpunya*, *Piper callosum*, *Piper amalago*, actividad antimicrobiana, microdilución colorimétrica, concentración mínima inhibitoria, elucidación estructural, aceite esencial, extracto etanólico.

SUMMARY

This descriptive, transversal and experimental research aims to determine the *in vitro* antimicrobial activity of essential oils and ethanolic extracts of leaves of *Piper acutifolium* Ruiz & Pav., *Piper carpunya* Ruiz & Pav., *Piper callosum* Ruiz & Pav. and *Piper amalago* L., collected in the departments of Cajamarca, Loreto and Amazonas, and structural elucidation of the components of its essential oils. The antimicrobial activity was evaluated by the method of agar diffusion and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by colorimetric microdilution method against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* methicillin resistant ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* environmental strain, *Bacillus cereus* food strain, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231. The essential oils of *P. acutifolium* Ruiz & Pav., *P. callosum* Ruiz & Pav. and *P. amalago* L. showed significant antimicrobial activity against *S. epidermidis* and *B. cereus*, while the ethanolic extract of *P. acutifolium* Ruiz & Pav. showed activity against *B. subtilis* (inhibition halos > 18 mm). Using the microdilution method, essential oils and ethanolic extracts showed antimicrobial activity with a MIC from 0.12 ± 0.06 to 0.26 ± 0.09 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and a MIC from 5.86 ± 2.76 to 145.83 ± 95.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ only against the Gram positive bacteria in study. In addition all essential oils and ethanolic extract of *P. callosum* Ruiz & Pav. showed good activity against *C. albicans*. The structural elucidation was performed by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) and found that sesquiterpenes were the major components followed by monoterpenes and phenylpropanoids.

Keywords: *Piper acutifolium*, *Piper carpunya*, *Piper callosum*, *Piper amalago*, antimicrobial activity, colorimetric microdilution, minimum inhibitory concentration, structural elucidation, essential oil, ethanolic extract.

I INTRODUCCIÓN

El Perú, considerado el tercer país más megadiverso del planeta, ha proveído importantes aportes de especies y variedades para el mundo. La flora peruana comprende alrededor de 50 mil especies (20% de las existentes en la Tierra) de las que 2000 han sido utilizadas con fines curativos. Actualmente, esta riqueza de promisorios agentes terapéuticos vegetales aunada al conocimiento ancestral de su uso etnofarmacológico constituyen un valioso recurso ofreciendo grandes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana ⁽¹⁾.

Por otro lado, las enfermedades infecciosas representan un problema crítico de salud pública y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial ⁽²⁾. La Organización Mundial de la Salud ha alertado sobre la existencia de tasas muy altas de resistencia a los agentes antimicrobianos por parte de las bacterias causantes de infecciones comunes adquiridas en la comunidad (infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, infecciones del torrente sanguíneo y neumonía), en todas las regiones del planeta ⁽³⁾. Los fármacos disponibles actualmente no siempre son eficaces debido a que poseen una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia ⁽⁴⁾. Por esta razón hay una necesidad de búsqueda de agentes alternativos derivados de plantas medicinales que puedan inhibir los microorganismos por mecanismos diferentes a los de uso actual, los cuales comprenden sustitutos más seguros o más eficaces para agentes antimicrobianos producidos sintéticamente ⁽⁵⁾.

Aproximadamente entre 25 y 50% de los fármacos son derivados de plantas. A pesar de los avances en química médica, que han permitido la síntesis de compuestos químicos, algunos medicamentos importantes de la medicina científica son todavía derivados directamente de las plantas por ser más económicos o por su complejidad. Las plantas son ricas en una gran variedad

de metabolitos secundarios como taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, los cuales han demostrado poseer propiedades antimicrobianas *in vitro* ⁽⁶⁾.

La susceptibilidad *in vitro* a los aceites esenciales y extractos de plantas ha sido probada ante una amplia gama de bacterias patógenas ^(6,7) siendo éstas importantes en la salud humana, lo que convierte a esta investigación en una oportunidad para aprovechar nuestra biodiversidad biológica y el potencial invaluable de las plantas medicinales como fuente de desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y/o fitomedicinas estandarizadas.

Asimismo, aunque la actividad biológica de los aceites esenciales y extractos ha sido confirmada en muchos estudios, los datos recogidos muestran una gran variabilidad. Las causas de ese comportamiento parecen ser las diferencias en la composición de las materias de estudio debido a factores genéticos, geobotánicos y ambientales principalmente. Es por eso que resulta de interés la identificación de los principales constituyentes responsables de la actividad antimicrobiana de las especies en estudio ^(8,9).

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Instituto de Investigación de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” y gracias a la colaboración de la Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

1.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro especies del género *Piper* y la elucidación estructural de los componentes de sus aceites esenciales.

1.2 Objetivos específicos

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los aceites esenciales y extractos etanólicos de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav, *Piper carpunya* Ruiz & Pav., *Piper callosum* Ruiz & Pav. y *Piper amalago* L. por el método de difusión en agar y microdilución en placa frente a ocho microorganismos de importancia en salud pública.

Realizar la elucidación estructural mediante Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas (CG/EM) de los componentes de los aceites esenciales de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav, *Piper carpunya* Ruiz & Pav., *Piper callosum* Ruiz & Pav. y *Piper amalago* L.

1.3 Hipótesis

Los aceites esenciales y extractos etanólicos de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav, *Piper carpunya* Ruiz & Pav., *Piper callosum* Ruiz & Pav. y *Piper amalago* L. poseen actividad antimicrobiana *in vitro*.

II GENERALIDADES

2.1 Familia Piperaceae

La familia Piperaceae se caracteriza porque sus especies son hierbas, arbustos o pequeños árboles. Posee un tallo con haces vasculares y nudos articulados o engrosados. Presenta hojas alternas rara vez opuestas o verticiladas, pecioladas, enteras, con estípulas adheridas al peciolo cuando existen, palmatinervias o penninervias, a menudo carnosas. Sus flores son muy pequeñas, con brácteas, generalmente bisexuales o a veces unisexuales, aclamídeas, por lo común reunidas en espigas densas y carnosas, o espigas umbeladas. Tienen un androceo de 1-10 estambres, hipóginos de filamentos cortos, generalmente libres, a veces adheridos a la base del ovario; anteras con 2 lóculos distintos o confluyentes hasta parecer uniloculares, con dehiscencia longitudinal; fruto con drupa pequeña (a menudo equivocadamente descrita como baya); semillas menudas con endosperma y embrión pequeño ⁽¹⁰⁾.

La familia Piperaceae pertenece al orden Piperales, el orden más rico en especies entre las angiospermas basales. Este orden comprende cinco familias (Aristolochiaceae, Hydnoraceae, Lactoridaceae, Piperaceae, Saururaceae) con más de 3610 especies ⁽¹¹⁾. La familia Piperaceae es reconocida en el Perú por presentar tres géneros y 830 especies ⁽¹²⁾.

Se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales del mundo ⁽¹³⁾. En el Neotrópico la familia se encuentra especialmente bien representada en los bosques andinos de media a baja elevación y es poco común en la selva tropical de la Amazonia central. Su utilización es muy diversa habiendo especies como especias: pimienta negra y blanca (frutos de *Piper nigrum*), como ornamental (*Peperomia*) y en medicina tradicional popular (*Piper*).

El género más rico en especies es *Piper*. Esta familia requiere mayor atención tanto en su taxonomía como en la representación en los herbarios. Los taxones

endémicos se encuentran principalmente en las regiones Bosques Húmedos Amazónicos, Bosques Muy Húmedos Montanos y Bosques Muy Húmedos Premontanos, entre los 100 y 2700 m de altitud ⁽¹²⁾.

2.2 Género *Piper*

Este género comprende, arbustos, hierbas o enredaderas y raras veces árboles. Son conocidos como “cordoncillos” debido a la presencia de diminutas flores agrupadas en una inflorescencia en forma de espiga o en racimos, con androceo formado entre 1-10 estambres y gineceo de 1-4 carpelos, poseen tallos elongados nudosos. Hojas alternas, pecioladas, simples, enteras o lobuladas solo en la base, iguales en la base foliar o desiguales con un lado más corto en el pecíolo, a veces peltada unidas al pecíolo, variando en textura desde membranosas hasta gruesas y coriáceas, de superficie lisa, rugosa en el haz hasta alveolada en el envés, mostrando a menudo, especialmente en el envés, puntos glandulares pálidos u oscuros o conspicuamente alados, más o menos vaginados, en la base diminutos puntos translúcidos. Pecíolo con márgenes usualmente angostos o con trayecto hasta la base foliar. Inflorescencia pedunculada con una espiga solitaria, sencilla opuesta a la hoja, lineal-cilíndrica, erecta, ascendente, o péndula, recta o raramente recurvada o arqueada. Flores numerosas, usualmente agrupadas densamente o con menos frecuencia, más aisladas y distantes, principalmente sésiles. Fruto con una semilla, carnoso o seco, globoso, piramidal invertido, cilíndrico o turbinado, redondo o anguloso, a veces comprimido lateralmente, trígono o cuadrangular, liso glabro, apilado-pulverulento o hispiduloso, especialmente hacia arriba y alrededor del ápice ^(14,15).

El género *Piper* se caracteriza por tener un gran número de especies ampliamente distribuidas a nivel mundial tendiendo alrededor de 2000 especies identificadas, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales ⁽¹⁶⁾. El Perú, por sus aspectos de ubicación, clima y suelo especiales, posee diversos

tipos de bosques y otras formas de vegetación con un gran número de especies vegetales, entre las que se encuentran alrededor de 483 especies del género *Piper* ⁽¹⁷⁾.

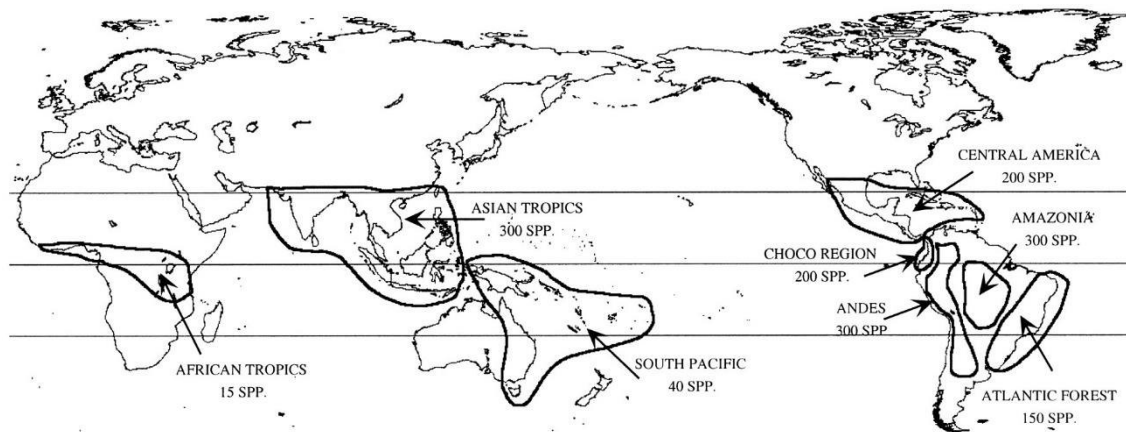


Figura 1: Distribución geográfica del género *Piper*. El número de especies son las estimaciones para cada uno de los centros de diversidad del grupo ⁽¹⁶⁾.

Las especies del género *Piper* tienen importancia comercial, económica y medicinal ⁽¹⁸⁾. En el Perú, varias especies de *Piper* conocidas con el nombre popular de “matico”, “nudillo” o “palo soldado”, son empleadas en la medicina tradicional en el tratamiento de constipados y neumonía, como antiinflamatorio, antiséptico, en el tratamiento de infecciones vaginales, dolencias digestivas y bronquiales ⁽¹⁹⁾.

2.3 Aspectos botánicos de las especies en estudio

A continuación describimos las especies vegetales utilizadas en la presente investigación.

2.3.1 *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.

Clasificación taxonómica:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : MAGNOLIIDAE
ORDEN : PIPERALES
FAMILIA : PIPERACEAE
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.

Sinónimos: *Artanthe acutifolia* (Ruiz & Pav.) Miq., *Piper acutifolium* var. *Stuebelii* Trel. in J.F.Macbr., *Piper mandonii* C. DC., *Piper mandonii* C. DC., *Steffensia acutifolia* (Ruiz & Pav.) Kunth., *Piper acutifolium* var. *acutifolium* ⁽²⁰⁻²²⁾.

Nombres comunes: Matico, Hierba del soldado ⁽²³⁾.

Descripción: Planta delgada erecta de 4 m de alto, tallos verdes, glabros, los nudos hinchados, hojas con corto peciolo, la superficie escabrosa, ovada, de 15x9 cm oblicuamente redondeada en la base, largamente atenuada en el ápice, glabra; nervadura secundaria mayor, levantada desde la mitad inferior de la vena medial, flores aclamídeas, inflorescencia en espiga o racimosa, de hasta 4 mm de grosor y 18 cm de largo, curvada, blanca ⁽²⁴⁾.

Distribución geográfica: En el Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas, Apurímac, Cajamarca, Cuzco, Huánuco y Pasco ⁽²⁵⁾. En Sudamérica se encuentra además en Ecuador y Bolivia ^(17,22).

Usos de la especie: En el lugar de recolección la infusión de las hojas es utilizada como desinfectante y desinflamante de heridas, para lograr mayor efecto se aplican las hojas ligeramente calentadas sobre las heridas y abscesos. El cocimiento de las hojas es también utilizado para lavados íntimos. También es utilizada para tratamiento de la dispepsia ⁽²³⁾.

Tabla 1. Ficha de recolección de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.

Nombre científico:	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.
Lugar de recolección	Distrito de Pulán, Provincia de Santa Cruz, Departamento de Cajamarca.
Geografía	Matorrales y en bosque Nublado (bosque montano bajo).
Altitud	2000 msnm.
Hábitat	Bosque nublado donde las lluvias están ausentes solo en los meses de julio a setiembre. Prospera en suelos húmedos de preferencia cerca a los arroyos.
Usos medicinales en la zona de recolección	Desinfectante y desinflamante de heridas, antiséptico de uso íntimo, cicatrizante en gastritis y úlcera gástrica.
Fecha de recolección	Mes de mayo en época lluviosa.



Figura 2. *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. ⁽²⁶⁾.

2.3.2 *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

Clasificación taxonómica:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : MAGNOLIIDAE
ORDEN : PIPERALES
FAMILIA : PIPERACEAE
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

Sinónimos: *Carpunya lessertiana* (Miq.), *Carpunya peruviana* Presl., *Carpupica odorata* Rafin., *Ottonia carpunya* (Ruiz & Pav.) Miq., *Ottonia lessertiana* Miq., *Piper cocherense* Trel., *Piper colombianum* C. DC., *Piper glabrirameum* C. DC., *Piper nieblyanum* C. DC., *Piper pallidirameum* C. DC., *Schilleria carpunya* (Ruiz & Pav.) Kunth. ^(20,25).

Nombres comunes: Carpundia, Condorcillo, Cordoncillo aromático u oloroso, Guaviduca, Guabiduca Dulce ^(23,27-29).

Descripción: Planta de unos 2-3 m. de alto con tronco nudoso, corteza externa con anillos horizontales. Hojas simples, alternas y dísticas, de lanceoladas hasta elípticas, con ápice acuminado, base aguda, de 9-14 cm de longitud y 4-7 cm de ancho, peciolo de 8-10 mm de longitud vaginado en la base. Inflorescencias en espigas de color blanco a verde, erguidas, de 7 a 11 cm de longitud y 3 mm de diámetro, se agrupan densamente en bandas transversales con pedúnculo de 6-8 mm de longitud. Flores pequeñas rodeadas por brácteas ovoides hasta redondas, corta y fuertemente fimbriadas en los márgenes; anteras con tecas de 0.2 mm de longitud, poseen estigmas largos y sésiles ⁽²⁷⁾.

Distribución geográfica: En el Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas, Huánuco y Cajamarca. Posee una amplia distribución en Ecuador en las provincias de Azuay, Chimborazo, Napo, Pastaza y Pichincha. Además se encuentra en Colombia y Costa Rica ⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Usos de la especie: Las hojas de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. son ampliamente utilizadas en la medicina popular de los países tropicales y subtropicales de América del Sur como antiinflamatorio, antiulceroso, antidiarreico y antiparasitario, así como para las dolencia de irritaciones de la piel ⁽³¹⁾. En el lugar de recolección, las hojas molidas son aplicadas sobre heridas actuando como un desinflamante, adicionalmente con éstas se puede preparar un “caldo de carpundia” que es utilizado como digestivo, carminativo y antiflatulento. La infusión de las hojas es tomada por los pobladores como tratamiento para resfríos y constipados. También es utilizada para el tratamiento de bronquitis ⁽²³⁾.

Tabla 2. Ficha de recolección de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

Nombre científico:	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.
Lugar de recolección	Distrito de San José de Lourdes, Provincia de San Ignacio, Departamento de Cajamarca.
Geografía	Bosque montano, en suelos secos con vegetación secundaria
Altitud	1112 msnm.
Hábitat	Bosque montano. Prospera en suelos secos, de tipo franco arcilloso.
Usos medicinales en la zona de recolección	Digestivo, carminativo, antiflatulento, desinflamante.
Fecha de recolección	Mes de mayo en época lluviosa.



Figura 3. *Piper carpunya* Ruiz & Pav. ⁽³²⁾.

2.3.3 *Piper callosum* Ruiz & Pav.

Clasificación taxonómica:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : MAGNOLIIDAE
ORDEN : PIPERALES
FAMILIA : PIPERACEAE
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper callosum* Ruiz & Pav.

Sinónimos: *Oxodium callosum* (Ruiz & Pav.) Rafin., *Peltobryon callosum* (Ruiz & Pav.) Miq., *Peltobryon poeppigii* Klotzsch ex Miq., *Piper benianum* Trelease, *Piper callosum* var. *franciscoanum* C. DC., *Piper poeppigii* (Klotzsch) C. DC., *Piper scabrum* Poepp. ex Kunth., *Schilleria callosa* (Ruiz & Pav.) Kunth. ^(20-22,25,33).

Nombres comunes: Huayusa macho, Guayusa, Condorcillo, Condorcillo guayusa ⁽²⁷⁾. Elixir paregórico, Ventre-livre, Erva de soldado y Oleo-eléctrico (portugués) ⁽³³⁾.

Descripción: Planta de unos 3 m de alto, perenne y con tronco nudoso. Corteza externa con anillos horizontales en todo el tronco. Hojas simples, alternas y dísticas, elípticas a veces lanceoladas, con ápice acuminado, la base aguda y equilátera, de 8 a 13 cm de longitud y de 4.5 a 7 cm de ancho; nervios secundarios pinnados, oblicuos. Pecíolo calloso, glabro y corto, de 8 a 10 mm de longitud, vaginado en la base. Inflorescencias en espigas de color blanco o crema, erguidas, de 2- 2.5 cm de longitud y 2-3 mm de diámetro, se agrupan densamente en bandas transversales, pedúnculos glabros de unos 7 mm de longitud. Flores pequeñas, rodeadas por brácteas redondas, cortas y densamente fimbriadas en los márgenes; anteras con tecas de 0.3 mm de longitud, lateralmente dehiscentes con estimas alargados ⁽²⁷⁾.

Distribución geográfica: En el Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas, Ayacucho, Huánuco, Junín, Pasco, Loreto, Madre de Dios, San Martín, Ucayali ^(21,25,25,33). Posee una amplia distribución en Bolivia incluyendo las provincias de Beni, Cochabamba, La Paz, Pando y Santa Cruz ^(22,34). Además puede encontrarse en Ecuador y Brasil ^(35,36).

Usos de la especie: La especie es utilizada ampliamente en medicina popular en la región Amazónica ⁽³⁵⁾. En el lugar de recolección la infusión de las hojas es utilizada como antidiarreico, energético, estimulante del apetito, diurético, digestivo y depurativo. Según conocimiento popular los pobladores suelen utilizar la especie para baños de florecimiento.

Tabla 3. Ficha de recolección de *Piper callosum* Ruiz & Pav.

Nombre científico:	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.
Lugar de recolección	Distrito de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto.
Geografía	Planta silvestre y en proceso de domesticación alrededor de las casas de algunas comunidades nativas de la selva amazónica.
Altitud	120 msnm.
Hábitat	Bosque siempre húmedo de la selva baja, en zonas no inundables.
Usos medicinales en la zona de recolección	Antidiarreico, energético, estimulante del apetito, diurético, digestivo y depurativo.
Fecha de recolección	Mes de mayo en época que va disminuyendo las lluvias en la selva baja.



Figura 4. *Piper callosum* Ruiz & Pav. ⁽³⁷⁾.

2.3.4 *Piper amalago* L.

Clasificación taxonómica:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE : MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE : MAGNOLIIDAE
ORDEN : PIPERALES
FAMILIA : PIPERACEAE
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper amalago* L.

Sinónimos: *Artanthe plantaginea* (Lam.) Miq., *Artanthe saururoides* (Desv. ex Ham.) Miq., *Enckea amalago* (L.) Griseb., *Enckea amalago* var. *hirtella* Griseb., *Enckea ceanothifolia* Kunth, *Enckea sieberi* Miq., *Enckea vernicea* Miq., *Ottonia plantaginea* (Lam.) Endl., *Piper amalago* f. *ceanothifolium* (Humb., Bonpl. & Kunth) J.A. Steyermark, *Piper amalago* var. *medium* (Jacq.) Yunck., *Piper berlandieri* C. DC., *Piper calvescens* Trel., *Piper ceanothifolium* Kunth, *Piper cobanense* Trel., *Piper cobanense* var. *sarculatum* Trel., *Piper cojimarum* Trel., *Piper comayaguanum* Trel., *Piper commutatum* Steud., *Piper cubilquitizianum* C. DC., *Piper decrescens* (Miq.) C. DC., *Piper gaumeri* Trel., *Piper henshenii* C. DC., *Piper hispaniolae* Trel., *Piper lundellianum* Trel., *Piper lundellii* Trel., *Piper macintoshii* Trel. & Stehle, *Piper medium* var. *ceanothifolium* (Kunth) Trel. & Yunck., *Piper plantagineum* Schldtl., *Piper realgoanum* C. DC., *Piper reticulatum* Vell., *Piper richardianum* C. DC., *Piper richardianum* var. *glabrifolium* C. DC., *Piper richardianum* var. *latilimbus* C. DC., *Piper saururoides* Ham., *Piper siguatepequense* Trel., *Piper syringifolium* Balb. ex Kunth, *Piper tiguano* C. DC., *Piper vaccinum* Standley & Steyerm., *Piper victorianum* C. DC., *Piper wilsonii* Trel., *Piper wulfschlaegelii* C. DC., *Steffensia plantaginea* Kunth. (20,21,38–41,41).

Nombres comunes: Matico, Palo soldado, Condorcillo Chico. Lum Pom, Puchuch, Tzac al bak (Maya) (42).

Descripción: Planta de unos 5 m de altura, con tronco nudoso que le otorga una apariencia articulada a la planta. Flores en espigas erectas como colas de ratón, no se curvan, oponiéndose a las hojas. Hojas lanceoladas, elípticas u oblongas, acuminadas en la punta, con 4 a 14 cm de largo y 2 a 7 cm de ancho, con nervios principales derivados de la base de la hoja. Flores pequeñas, de color blanco a amarillo, acomodadas a manera de cordón cubriendo los picos más corto o más largo que las hojas ⁽⁴³⁾.

Distribución geográfica: Posee una amplia distribución en Centroamérica incluyendo los países de Guatemala ⁽⁴⁴⁾, El Salvador ⁽⁴⁵⁾, Honduras ⁽³⁸⁾, Panamá ⁽³⁹⁾ y Costa Rica ⁽⁴⁶⁾; en Guatemala la planta puede encontrarse en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá, Suchitepéquez y Zacapa ⁽⁴⁴⁾; en El Salvador puede encontrarse en los departamentos de Ahuachapán, La Libertad, La Paz, La Unión, Mozarán, San Miguel, San Salvador, Santa Ana, Sonsonate y Usulután ⁽⁴⁵⁾. En el Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas y San Martín ⁽²⁵⁾. Además puede encontrarse en Ecuador, Brasil, Bolivia, México, Jamaica, Venezuela y Surinam ^(21,45,47).

Usos de la especie: Se ha utilizado en la medicina popular como un antiinflamatorio, analgésico, antipirético, diurético, cicatrizante, antihemorrágico, antimicrobiano y para aliviar problemas de pecho y estómago ^(27,48-50). En el lugar de recolección el jugo de las hojas verdes se utiliza como cicatrizante, desinfectante y antihemorrágico. El jugo de las hojas y peciolos se escurre sobre las heridas para cicatrizarlas.

Adicionalmente es utilizada tradicionalmente por los curanderos mayas para el tratamiento de "susto", un síndrome cultural. Esto ha generado recientes investigaciones que demuestran que la especie presenta actividad ansiolítica ⁽⁵¹⁾.

Tabla 4. Ficha de recolección de *Piper amalago* L.

Nombre científico:	<i>Piper amalago</i> L.
Lugar de recolección	Distrito de Camporredondo, Provincia de Luya, Departamento de Amazonas.
Geografía	Planta silvestre que está asociada a la selva tropical en bosque seco espinoso del valle del marañón.
Altitud	1400 msnm.
Hábitat	Bosque seco y bosque montano bajo, se encuentra en los cercos de chacras y zonas alteradas por la agricultura, de preferencia en suelo franco arenoso, en vegetación secundaria influenciado por la humedad del agua de los ríos, quebradas o arroyos permanentes
Usos medicinales en la zona de recolección	Cicatrizante, desinfectante y antihemorrágico.
Fecha de recolección	Mes de julio en época de verano con lluvias atípicas.



Figura 5. *Piper amalago* L. ⁽⁴²⁾.

2.4 Plantas medicinales

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que data desde tiempos inmemoriales. El hombre siempre ha buscado y encontrado en las plantas los remedios contra las enfermedades. Descubrió que algunas plantas son buenas como alimentos y otras tienen propiedades curativas. Ese fue el primer paso en el largo proceso de selección y separación de especies medicinales de las tóxicas ⁽⁵²⁾. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y se amplíe sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen, como lo son los aceites esenciales y los extractos ⁽⁵³⁾.

Las plantas medicinales constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas, aceites esenciales o sus principios activos ^(54,55).

En el Perú, la riqueza de las plantas medicinales es muy amplia y está enmarcada dentro de más de 4400 especies con usos conocidos por las poblaciones locales ⁽¹⁹⁾. Nuestro país presenta una riqueza y megadiversidad de plantas medicinales nativas, que es uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional desde la época del Incanato hasta la actualidad, siendo estas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud ⁽⁵⁶⁾.

2.5 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Los ensayos de evaluación de la actividad antimicrobiana hace unas décadas eran inconsistentes, no contaban con métodos estandarizados y eran muy poco reproducibles ya que muchos factores influían en el resultado de éstos, como el tamaño del inóculo, la composición y el pH del medio, la temperatura y duración de la incubación, etc. ^(57,58).

El Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS), actualmente el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) durante más de 40 años ha desarrollado y promovido el uso de guías de prácticas clínicas y de laboratorio manteniendo los estándares e impulsando las prácticas de calidad. A continuación se describen los tres métodos aceptados por el CLSI que han demostrado proporcionar de forma coherente resultados reproducibles y repetibles ⁽⁵⁹⁾.

a. Difusión en agar

Difusión de un agente antimicrobiano a una concentración conocida desde discos, tabletas, tiras, o pozos que sirven como reservorio en el medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con un inóculo seleccionado aislado en un cultivo puro. La difusión en agar se basa en la determinación de una zona de inhibición proporcional a la susceptibilidad bacteriana del antimicrobiano presente en el disco o pozo. El diámetro de esta zona de inhibición alrededor del disco o pozo se correlaciona inversamente con la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la bacteria de ensayo. En general, cuanto mayor sea la zona de inhibición, menor es la concentración de agente antimicrobiano necesario para inhibir el crecimiento de los organismos. Sin embargo, esto depende de la concentración de antibiótico en el disco o pozo y su capacidad de difusión en el agar ⁽⁶⁰⁾.

Este método es frecuentemente utilizado para investigación, pero tiene la desventaja de ser poco representativo en casos en los cuales la muestra difunde con dificultad en el medio debido a la inexistente relación entre el poder de difusión y la actividad antimicrobiana lo cual fue demostrado por Pellecuer et al. (61,62).

b. Dilución en caldo

Técnica en la que una suspensión de bacterias a una concentración óptima o adecuada predeterminada se comprueba frente a concentraciones variables de un agente antimicrobiano (por lo general diluciones dobles seriadas) en un medio líquido de la formulación predeterminada. El método de dilución en caldo se puede realizar ya sea en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 mL (macrodilución) o en volúmenes más pequeños utilizando placas de microtitulación (microdilución). El uso de estas placas, con un protocolo de pruebas documentado, incluyendo la especificación de los organismos de referencia adecuados, facilitará la comparabilidad y la reproducibilidad de los resultados (63,64).

Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y de procesar una gran cantidad de muestras; además de ofrecer la posibilidad de utilizarla en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales (61).

c. Dilución en agar

El método de dilución en agar implica la incorporación de concentraciones variables de un agente antimicrobiano en un medio de agar, por lo general utilizando diluciones dobles seriadas, seguido de la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de agar de la placa (63,64).

2.6 Metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos

Muchas de las propiedades terapéuticas que se les atribuyen a las plantas provienen principalmente de los metabolitos secundarios, los cuales son compuestos químicos derivados de la biosíntesis, transformación y degradación de éstos en proteínas de especialización y que resultan de procesos de diferenciación, clasificándose de acuerdo a su significado biológico y función en la planta ⁽⁶⁵⁾.

Los efectos medicinales beneficiosos de materiales vegetales típicamente resultan de las combinaciones de metabolitos secundarios presentes en la planta. Algunos de los metabolitos presentan actividad biológica contra agentes patógenos de humanos ofreciendo una fuente alternativa de los recursos disponibles en el combate de enfermedades infecciosas ^(66,67). Los grupos de metabolitos más importantes que se han reportado como agentes antimicrobianos, de acuerdo a Daciana & Bara ⁽⁶⁸⁾, son los siguientes:

- a. **Fenoles, polifenoles simples y ácidos fenólicos.** El ácido caféico es un ejemplo de estos compuestos y es efectivo contra virus, bacterias y hongos. Se cree que los grupos hidroxilo que tienen este tipo de compuestos son los que son responsables de su toxicidad contra microorganismos patógenos.

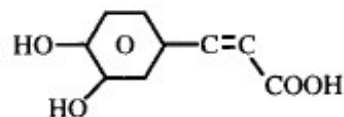


Figura 6. Estructura del ácido caféico ⁽⁶⁸⁾.

- b. **Quinonas.** Grupo de compuestos aromáticos altamente reactivos con dos sustituciones de cetonas. Son ubicuos en la naturaleza y se caracterizan por ser altamente reactivos. Se caracterizan por su compleja irreversibilidad al combinarse con los aminoácidos de las proteínas, con lo cual las inactivan provocando que pierdan sus funciones. Los probables

objetivos en la célula microbiana son adhesinas expuestas en la superficie, polipéptidos de la pared celular, y las enzimas unidas a la membrana.



Figura 7. Estructura de Quinonas ⁽⁶⁸⁾.

- c. **Flavonoides, flavonas, y flavonoles.** Compuestos fenólicos con un grupo carbonilo. Los flavonoides también contienen grupos hidroxilo y se agrupan generalmente a un anillo aromático. Su actividad antimicrobiana probablemente se deba a su capacidad para formar complejos con las proteínas extracelulares y para formar complejos con las paredes celulares bacterianas, como se describió anteriormente para quinonas. Los flavonoides que son lipofílicos también pueden romper las membranas microbianas. Adicionalmente se ha demostrado que los flavonoides presentan efectos inhibidores contra múltiples virus.

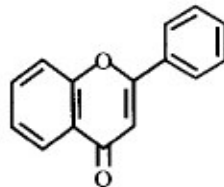


Figura 8. Estructura general de las flavonas ⁽⁶⁸⁾.

- d. **Taninos.** Grupo de compuestos fenólicos poliméricos que poseen la capacidad de unirse a proteínas y desnaturalizarlas (astringencia). Se dividen en dos grupos: hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables se basan en el ácido gálico, por lo general como múltiples ésteres con D-glucosa, mientras que los más numerosos taninos condensados (a menudo llamadas proantocianidinas) se derivan a partir de monómeros de flavonoides. Los taninos también se pueden formar por la polimerización de unidades de quinonas.

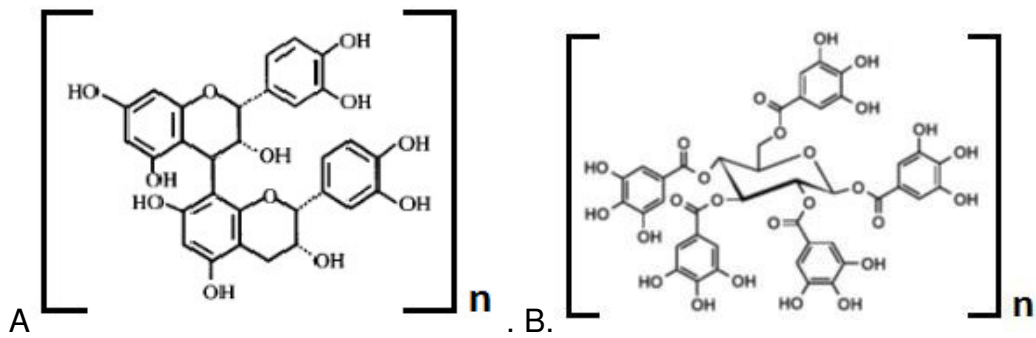


Figura 9. Estructuras de taninos. A: Tanino condensado.
B: Tanino hidrolizable ⁽⁶⁸⁾.

Se le atribuyen capacidades biológicas tales como estimulación de las células fagocíticas, la actividad tumoral mediados por el huésped, y una amplia gama de acciones antiinfecciosas contra bacterias, levaduras, hongos filamentosos, etc. Su capacidad antimicrobiana proviene de su habilidad para inactivar adhesinas, enzimas, proteínas de transporte, etc.

- e. **Cumarinas.** Compuestos fenólicos resultado de la fusión de anillos bencénicos y pironas. Las actividades más representativas que tiene son antiinflamatorias, vasodilatadoras y antitrombóticas. Los reportes sobre su actividad antimicrobiana son escasos por lo que se necesita mayor información de éstos. Adicionalmente, se ha reportado que algunos compuestos de este grupo tienen actividades fungicidas.

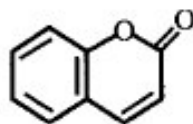


Figura 10. Estructura de las cumarinas ⁽⁶⁸⁾.

- f. **Terpenos, terpenoides y aceites esenciales.** Los aceites esenciales contienen metabolitos secundarios que están altamente enriquecidos en compuestos basados en una estructura de isopreno. Entre ellos se encuentran los hemiterpenos (C₅), terpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀), tetraterpenos (C₄₀)

y politerpenos (>C₄₀). Cuando los compuestos contienen elementos adicionales, por lo general el oxígeno, se denominan terpenoides. La fragancia de las plantas se realiza en la fracción denominada quinta esencia o aceite esencial. Estos aceites esenciales se encuentran reportados como antibacterianos, fungicidas, antivirales y antiparasitarios.

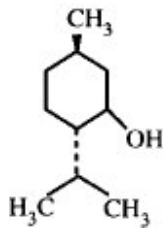


Figura 11. Estructura del mentol ⁽⁶⁸⁾.

- g. **Lecitinas y polipéptidos:** Se encuentran reportados como antimicrobianos tóxicos ante levaduras, bacterias Gram negativas y Gram positivas. Generan un reciente interés por su acción antiviral.
- h. **Alcaloides.** Grupo de compuestos muy diversos que se consideran uno de los grupos de metabolitos más eficientes y terapéuticamente más significativos. Las actividades biológicas más representativas que tienen son como analgésicos, antiespasmódicos y antibacterianos. Generalmente son muy tóxicos por lo que cuando se les utiliza como agentes terapéuticos, la cantidad empleada debe ser mínima.

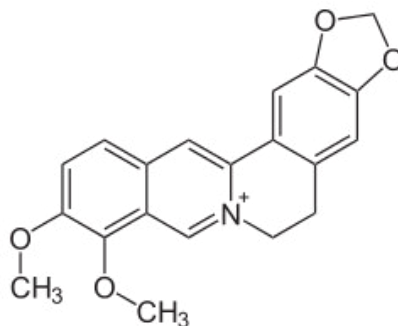


Figura 12. Estructura de un alcaloide (Berberina) ⁽⁶⁸⁾.

III PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y equipos

Material vegetal

- *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- *Piper amalago* L.

Material biológico

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ATCC 33591
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Bacillus subtilis* cepa ambiental
- *Bacillus cereus* cepa alimentaria
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Candida albicans* ATCC 10231

Materiales

- Pipetas de vidrio 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Probetas de vidrio 100 mL y 500 mL
- Beakers de vidrio 250 mL
- Frascos ámbar de vidrio 150 mL
- Tips de 100 µL y 1000 µL

- Sacabocados
- Placas Petri de plástico
- Tubos de ensayo de vidrio
- Baguetas de vidrio
- Micropipetas (Eppendorf)
- Micropipeta multicanal (Eppendorf)
- Viales de vidrio
- Microplaca estéril de 96 pozos con fondo en U (Brand)

Reactivos

- Etanol Q.P. (Merck)
- Sulfato de sodio anhidro (Merck)
- Dimetilsulfóxido (Merck)
- Resazurina (Sigma-Aldrich)
- Ketoconazol (Potencia: 100.50%, Laboratorios Induquímica)
- Ciprofloxacino (Potencia: 94.10 %, Laboratorios Induquímica)
- Agua destilada

Medios de cultivo

- Medio RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato (Sigma-Aldrich)
- Buffer ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich)
- Agar Dextrosa Sabouraud al 4% (Merck)
- Agar Mueller Hinton (Merck)
- Agar Trypticase Soya (Merck)
- Caldo Mueller Hinton (Merck)

Equipos

- Autoclave (Chincan LDZX-50KBS)
- Equipo de destilación por arrastre de vapor de acero inoxidable
- Balanza analítica (Sartorius CPA224S)
- Estufa (Mettler)
- Picnómetro (Lasany)
- Refrigeradora (Bosch)
- Cromatógrafo de Gases/ Espectrometría De Masas (CG/EM) modelo CG:
Trace / EM: Trace
- Incubadora (INCUCCELL)

3.2 Metodología

3.2.1 Tipo de estudio

Descriptivo, transversal y experimental.

3.2.2 Recolección e identificación de las especies

Las plantas maduras y en estado de fructificación fueron recolectadas en los departamentos Cajamarca, Loreto y Amazonas durante los meses mayo - junio del 2015 (Tabla 5) utilizando la técnica descrita por Cerrate ⁽⁶⁹⁾.

Se recolectaron 5 Kg de cada especie y se sometieron a un proceso de secado con la finalidad de facilitar el proceso de extracción y así mismo lograr un mayor tiempo de almacenaje ya que la extracción de todas las especies no fue de forma inmediata ⁽⁷⁰⁾. El secado de las hojas se realizó mediante secado natural en un lugar ventilado a luz difusa. Se transportaron por medio terrestre en envases cerrados y etiquetados para evitar la contaminación.

La identificación y clasificación taxonómica de las especies vegetales fue realizada por el biólogo José Campos de la Cruz, consultor botánico (Anexos 1-5).

Tabla 5. Plantas seleccionadas y datos de recolección.

Especie	Nombre Común	Lugar de Recolección Distrito, Provincia, Dpto.	Parte usada
<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	Matico	Pulán, Santa Cruz, Cajamarca	Hojas
<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	Carpundia	San José de Lourdes, San Ignacio, Cajamarca	Hojas
<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	Huayusa macho	Iquitos, Maynas, Loreto	Hojas
<i>Piper amalago</i> L.	Palo soldado	Camporredondo, Luya, Amazonas	Hojas

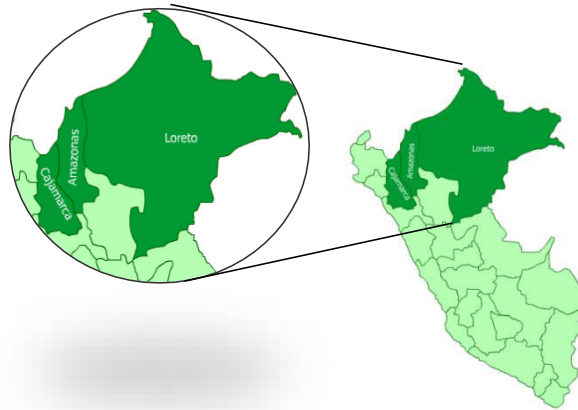


Figura 13: Ubicación geográfica de los departamentos de recolección de las especies vegetales en estudio en el Perú.

3.2.3 Extracción de aceites esenciales

Para la extracción de los aceites esenciales se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor de agua con un equipo de acero inoxidable según la técnica descrita por Rodríguez ⁽⁷¹⁾ modificada. Se emplearon 4 Kg de hojas secas de cada especie vegetal estudiada, utilizándose aproximadamente 1 Kg de hojas secas por ciclo de destilación.

Los aceites esenciales obtenidos se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro para luego filtrarlos, conservarlos y refrigerarlos a una temperatura que no supere los 4 C° en frascos ámbar herméticos.

3.2.4 Análisis preliminar de los aceites esenciales

Para el análisis organoléptico se utilizó el método adaptado de Dixit ⁽⁷²⁾, el cual constó de una inspección visual del aceite esencial. Además se midió la densidad utilizando el método descrito en la United States Pharmacopeia 38 <841>-Metodo I ⁽⁷³⁾. El rendimiento (R_{ae}) se determinó por el método gravimétrico - volumétrico mediante la siguiente expresión ⁽⁷⁴⁾:

$$R_{ae} = \text{Vol.}_{ae} \text{ (mL)} / P_{\text{muestra}} \text{ (g)} \times 100$$

Donde: Vol._{ae} : Volumen del aceite esencial obtenido; en mL.

P_{muestra}: Peso de la muestra a destilar; en g.

3.2.5 Preparación de los extractos

Se realizó una maceración a temperatura ambiente con hojas molidas de cada especie en estudio en la proporción de 10 g por 90 mL de etanol Q.P siguiendo la técnica descrita por Ruiz J. ⁽⁷⁵⁾. El solvente fue luego evaporado a sequedad en una estufa a una temperatura que no supere los 40 °C. Para los ensayos correspondientes, los extractos secos fueron resuspendidos con dimetilsulfoxido (DMSO) a una concentración de 25 mg/mL.

3.2.6 Marcha fitoquímica preliminar de los extractos

Las reacciones de identificación de metabolitos secundarios se realizaron mediante las técnicas de Lock de Ugaz O., las cuales se basan en la caracterización química de los diferentes grupos funcionales que integran las estructuras de los metabolitos ⁽⁷⁶⁾.

3.2.7 Método de difusión en agar

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido y se evidencia por la formación de halos claros alrededor de la sustancia activa ⁽⁷⁷⁻⁷⁹⁾.

3.2.7.1 Microorganismos de estudio

Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizaron las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* cepa ambiental, *Bacillus cereus* cepa alimentaria, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

3.2.7.2 Preparación del inóculo

Las bacterias y la levadura fueron reactivadas en agar Mueller Hinton y en agar dextrosa Sabouraud respectivamente. Se suspendieron los microorganismos en solución salina 0.9% estéril y se ajustó la turbidez al equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland equivalente a una concentración aproximada de $1 - 1.5 \times 10^8$ UFC/mL y equivalente a 1.5×10^6 UFC/mL para la levadura ^(59,77).

3.2.7.3 Preparación de la muestra

Los aceites esenciales de las especies en estudio se trabajaron a las siguientes concentraciones: 10%, 50% y 100% utilizando como medio diluyente DMSO. Los extractos secos fueron resuspendidos con DMSO hasta alcanzar una concentración de 25 mg/mL.

3.2.7.4 Preparación de las placas

Se utilizó el agar Mueller Hinton para las bacterias y el agar dextrosa Sabouraud para la levadura, previamente reconstituidos, esterilizados, enfriados y mantenidos a 45 °C. Estos fueron inoculados con 1 mL de suspensión del inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo para su posterior homogenización y distribución en placas Petri de vidrio estériles de 90 mm de diámetro, a razón de 25 mL por placa. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo testigo. Finalmente se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 10 mm de diámetro externo.

3.2.7.5 Adición de las muestras e incubación de las placas

Se agregó 100 µL de los respectivos aceites esenciales (100%, sus diluciones al 50% y 10%) y extractos etanólicos (25 mg/mL) de las diferentes muestras en los pozos, se dejó reposar por 60 minutos para difusión a temperatura ambiente y se llevó a incubación en estufa a 37 °C por 24 h.

3.2.7.6 Preparación de los controles

Para el ensayo se utilizó como controles positivos Ciprofloxacino (5 µg/disco) y Ketoconazol (0.2 mg/mL) disuelto en DMSO. Como control negativo se utilizó DMSO. Las pruebas se realizaron por triplicado.

3.2.7.7 Lectura de resultados

Se observaron las zonas de inhibición del crecimiento (halos) y se midieron los diámetros en mm ⁽⁵⁹⁾. La medida de los halos de inhibición incluyó la

medida de 10 mm del pozo. Se consideró que tiene una actividad antimicrobiana significativa a un halo de inhibición mayor a 18 mm ⁽⁷⁸⁾.

3.2.8 Método de microdilución

Se realizó una prueba de microdilución colorimétrica de las muestras y controles para determinar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias y hongos (CMI). Para las pruebas con *Candida albicans* se usó el protocolo CLSI M27- A3 ⁽⁶⁴⁾, y las modificaciones de Liu M y col. ⁽⁸⁰⁾; mientras que para las bacterias se usó el protocolo CLSI M07-A10 modificado ⁽⁶³⁾.

3.2.8.1 Microorganismos de estudio

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria se utilizaron las siguientes bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* cepa ambiental, *Bacillus cereus* cepa alimentaria, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 del laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

3.2.8.2 Preparación de las muestras

Aceites

En la prueba de microdilución se diluyó mililitros del aceite esencial en DMSO en diluciones dobles seriadas adaptando el esquema de diluciones de drogas insolubles en agua de los protocolos CLSI M27-A3 y CLSI M07-

A10; obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales, que están en el rango de 0.157 - 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los cuatro aceites esenciales trabajados. Para realizar la conversión a p/v se multiplicó por la densidad de cada aceite esencial (Tabla 11). La concentración final de DMSO fue igual o inferior al 5% (v/v). Se siguió el esquema de la siguiente tabla.

Tabla 6. Dilución de los aceites esenciales.

Dilución de los aceites esenciales						
Paso	Concentración ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Fuente	Volumen (mL)	+ DMSO (mL) solvente	= Concentración intermedia ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	= Concentración final 2X a 1:50 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)
1	1000	Stock			1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$	80 (1:12.5)
2	1000	Stock			1000	40 (1:25)
3	1000	Stock			1000	20
4	1000	Stock	0.5	0.5	500.00	10
5	1000	Stock	0.5	1.5	250.00	5
6	1000	Stock	0.5	3.5	125.00	2.5
7	12.5	Paso 6	0.5	0.5	62.5	1.25
8	12.5	Paso 6	0.5	1.5	32.25	0.625
9	12.5	Paso 6	0.5	3.5	16.125	0.313
10	16.125	Paso 9	0.5	0.5	8.063	0.157

Extractos

En la prueba de microdilución, una solución de los extractos secos resuspendidos en DMSO a la concentración de 25 mg/mL fue diluida en diluciones dobles seriadas, adaptando el esquema de diluciones de drogas insolubles en agua de los protocolos CLSI M27-A3 y CLSI M07-A10; obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales, que están en el rango de 0.977 - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de los cuatro extractos etanólicos trabajados. La concentración final de DMSO fue igual o inferior al 5% (v/v). Se siguió el esquema de la siguiente tabla.

Tabla 7. Dilución de los extractos.

Dilución de Extractos						
Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	+ DMSO (mL) solvente	= Concentración intermedia (µg/mL)	= Concentración final 2X a 1:50 (µg/mL)
1	25000	Stock			25000 µg/mL	500 (1:12.5)
2	25000	Stock	0.5	0.5	12500	250 (1:25)
3	25000	Stock	0.5	1.5	6250	125
4	25000	Stock	0.5	3.5	3125	62.5
5	3125	Paso 4	0.5	0.5	1562.5	31.25
6	3125	Paso 4	0.5	1.5	781.25	15.625
7	3125	Paso 4	0.5	3.5	390.625	7.813
8	390.62	Paso 7	0.5	0.5	195.3125	3.906
9	390.62	Paso 7	0.5	1.5	97.65625	1.953
10	390.62	Paso 7	0.5	3.5	48.828125	0.977

3.2.8.3 Preparación de los controles

Los controles positivos utilizados para las pruebas fueron Ketoconazol y Ciprofloxacino. El Ketoconazol se solubilizó en DMSO y fue preparado a 1600 µg/mL, siguiendo las normas del CLSI a una concentración mínima 100 veces mayor a la concentración a ser probada, en este caso 16 µg/mL. El Ciprofloxacino se solubilizó en agua y fue preparado a 6400 µg/mL siguiendo las mismas normas, 100 veces mayor a la concentración a ser probada, en este caso 64 µg/mL. La concentración de los controles fue desde 0.032 a 16 µg/mL y desde 0.125 a 64 µg/mL para Ketoconazol y Ciprofloxacino respectivamente. Se utilizó como control de esterilidad el medio RPMI 1640 con resazurina de acuerdo al protocolo de Liu M y col. en el caso de Ketoconazol ⁽⁸⁰⁾ y el caldo Mueller Hinton con resazurina en el caso del Ciprofloxacino ⁽⁶³⁾.

Tabla 8. Dilución del Ketoconazol.

Dilución de Ketoconazol						
Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	+ DMSO (mL) solvente	= Concentración intermedia (µg/mL)	= Concentración final 2X a 1:50 (µg/mL)
1	1600	Stock			1600 µL/mL	32
2	1600	Stock	0.5	0.5	800	16
3	1600	Stock	0.5	1.5	400	8
4	1600	Stock	0.5	3.5	200	4
5	200	Paso 4	0.5	0.5	100	2
6	200	Paso 4	0.5	1.5	50	1
7	200	Paso 4	0.5	3.5	25	0.5
8	25	Paso 7	0.5	0.5	12.5	0.25
9	25	Paso 7	0.5	1.5	6.25	0.125
10	25	Paso 7	0.5	3.5	3.125	0.063

Tabla 9. Dilución del Ciprofloxacino.

Dilución de Ciprofloxacino						
Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen (mL)	+ H ₂ O (mL) solvente	= Concentración intermedia (µg/mL)	= Concentración final 2X a 1:50 (µg/mL)
1	6400	Stock			6400 µg/mL	128
2	6400	Stock	0.5	0.5	3200	64
3	6400	Stock	0.5	1.5	1600	32
4	6400	Stock	0.5	3.5	800	16
5	800	Paso 4	0.5	0.5	400	8
6	800	Paso 4	0.5	1.5	200	4
7	800	Paso 4	0.5	3.5	100	2
8	100	Paso 7	0.5	0.5	50	1
9	100	Paso 7	0.5	1.5	25	0.5
10	100	Paso 7	0.5	3.5	12.5	0.25

3.2.8.4 Preparación del inóculo

Con la finalidad de obtener un mayor número de células viables se realizó un repique de los microorganismos en estudio 24 horas antes de la prueba de determinación de la CMI en agar tripticosa soya, incubado a condiciones aerobias a 37 °C. El día del ensayo, una pequeña alícuota del

microorganismo fue transferida a un tubo de ensayo conteniendo solución salina estéril 0.9%, hasta alcanzar un grado de turbidez semejante al tubo 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a $1 - 1.5 \times 10^8$ UFC/mL para bacterias y $1 - 1.5 \times 10^6$ UFC/mL para levaduras (inóculo concentrado). En seguida se realizó una doble dilución de 1:50 utilizando el medio RPMI 1640 en el caso de *Candida albicans* y de 1:20 con caldo Mueller Hinton en el caso de las bacterias en estudio para obtener un inóculo de $1 - 5 \times 10^5$ UFC/mL (inóculo 2x).

Para la prueba de microdilución se procedió teniendo en cuenta que por cada 20 mL de la suspensión del inóculo 2x se agregó 0.1 mL de la solución de resazurina 20 mg/mL previamente preparada ⁽⁸⁰⁾.

3.2.8.5 Procedimiento de la prueba de microdilución colorimétrica

La prueba de microdilución fue realizada en microplacas de 96 pozos estériles, de fondo en U ⁽⁸¹⁾. De manera general la distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución (Tabla 10).

En cada pozo se colocó 100 μ L de la dilución 2x de la muestra o control correspondiente y luego se agregó 100 μ L del inóculo 2x con el indicador resazurina. Por otro lado también se considera pozos de control de esterilidad (RPMI 1640 o caldo Mueller Hinton, según corresponda) y pozos de control de crecimiento (caldo Mueller Hinton con inóculo de las bacterias en estudio o RPMI 1640 con inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231). Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones aerobias.

3.2.8.6 Lectura de resultados

La lectura de resultados se hizo visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado o incoloro se registraron como positivos. Los valores de CMI se definen como la concentración más baja de aceite esencial o extracto en estudio que impide un cambio de color de la resazurina ⁽⁸²⁾. El promedio de tres valores fueron calculados y se reportaron como la CMI.

Tabla 10. Diseño de la bandeja de microdilución.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CE	250	125	62.5	31.25	15.625	7.813	3.906	1.953	0.977	0.489	CP	E1
B	CE	250	125	62.5	31.25	15.625	7.813	3.906	1.953	0.977	0.489	CP	E2
C	CE	250	125	62.5	31.25	15.625	7.813	3.906	1.953	0.977	0.489	CP	E3
D	CE	250	125	62.5	31.25	15.625	7.813	3.906	1.953	0.977	0.489	CP	E4
E	CE	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157	0.079	CP	A1
F	CE	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157	0.079	CP	A2
G	CE	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157	0.079	CP	A3
H	CE	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.157	0.079	CP	A4

Leyenda: CE: Control de esterilidad, CP: Control positivo

- E1. Extracto de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- E2. Extracto de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- E3. Extracto de *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- E4. Extracto de *Piper amalago* L.
- A1. Aceite esencial de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- A2. Aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- A3. Aceite esencial de *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- A4. Aceite esencial de *Piper amalago* L.

3.2.8.7 Interpretación de resultados

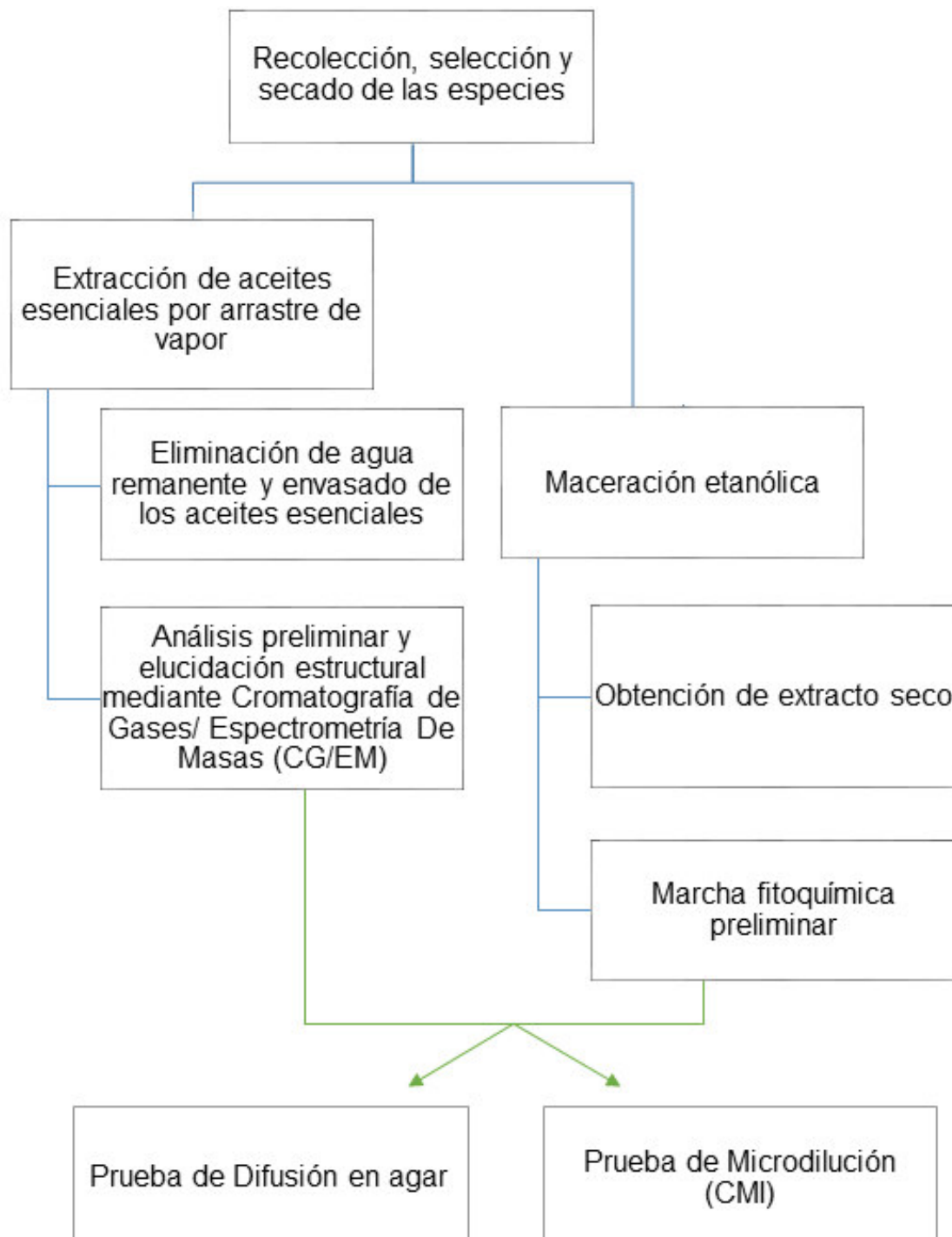
Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta los parámetros de Paredes. y col. ⁽⁸³⁾. Se consideró que los extractos etanólicos y aceites esenciales tenían una actividad antimicrobiana cuando el CMI \leq 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La actividad antimicrobiana se clasifica de la siguiente manera.

Actividad antimicrobiana	CMI
Débil actividad	500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Moderada actividad	100 a < 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Buena actividad	< 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3.2.9 Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales

Los cuatro aceites esenciales estudiados se analizaron utilizando un Cromatógrafo de Gases/ Espectrómetro de Masas (CG/EM) modelo CG: Trace / EM: Trace, utilizando una columna Restek (low-polarity phase; Crossbond diphenyl dimethyl polysiloxane). Este análisis se llevó a cabo en el Instituto de Medicina Legal – Sub Gerencia de Laboratorio de Toxicología y Química Legal (Anexo 6).

3.3 Flujograma de trabajo experimental



IV RESULTADOS

4.1 Análisis preliminar de los aceites esenciales

La Tabla 11 muestra las características sensoriales, densidad y rendimiento de los aceites esenciales en estudio

Tabla 11: Propiedades físicas y rendimiento de los aceites en estudio:

	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.
Aspecto	Líquido oleoso traslúcido	Líquido oleoso traslúcido	Líquido oleoso traslúcido	Líquido oleoso traslúcido
Color	Incoloro a amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido	Amarillo pálido a amarillo intenso
Olor	Fuerte olor aromático	Fuerte olor aromático	Fuerte olor aromático	Fuerte olor aromático
Sabor	Acre	Acre	Acre	Acre
Densidad (25°C)	0.8030	0.8672	0.8106	0.7952
Rendimiento	0.42%	0.14%	0.08%	0.27%

4.2 Marcha fitoquímica preliminar de los extractos

La Tabla 12 muestra los resultados de la marcha fitoquímica realizada a los extractos etanólicos de las especies en estudio.

Tabla 12. Marcha fitoquímica de los extractos etanólicos

Reactivo	Metabolito secundario	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.
Shinoda	Flavonoide	(++++)	(+)	(++)	(+++)
Sulfato de Cerio	Flavonoide	(++++)	(+++)	(+++)	(+++)
Bortrangër	Antraquinonas	(++)	(++)	(-)	(+++)
Dragendorff	Alcaloide	(-)	(-)	(-)	(-)
Wagner	Alcaloide	(-)	(-)	(-)	(-)
Bertrand	Alcaloide	(-)	(-)	(-)	(-)
Indice afrosimétrico	Saponina	(-)	(-)	(-)	(-)
Gelatina	Tanino	(+)	(+)	(++)	(+)
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	(+++)	(+++)	(+)	(+)
Lieberman-Bouchardat	Triterpenoides y esteroides	(-)	(+++)	(-)	(+)

Leyenda: (++++) muy abundante; (+++) abundante; (++) regular; (+) poca cantidad; (-) ausente

4.3 Actividad antimicrobiana

4.3.1 Método de difusión en agar

Los resultados de este estudio se muestran en las Tablas 13-18 y Figuras 14-17.

Tabla 13. Actividad antibacteriana y antifúngica mediante el método de difusión en agar de aceites esenciales y extracto de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.

Microorganismos		Zona de Inhibición (mm)			
		Aceites esenciales			Extracto
		100%	50%	10%	25 mg/ml
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.25 ± 0.35	15.25 ± 1.77	13.5 ± 0.71	18 ± 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente ATCC 33591	13 ± 0	13.75 ± 1.06	12 ± 0	16 ± 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	16.25 ± 0.35	22 ± 5.66	15 ± 1.41	17 ± 0
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	12 ± 0	12.5 ± 0.71	13.5 ± 0.71	24.5 ± 0.71
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	13.75 ± 1.06	18.25 ± 2.47	13 ± 0	19 ± 0
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10 ± 0	11.5 ± 2.12	14.5 ± 0.71	15.75 ± 3.18

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

Tabla 14. Actividad antibacteriana y antifúngica mediante el método de difusión en agar de aceites esenciales y extracto de *Piper carpubya* Ruiz & Pav.

Microorganismos		Zona de Inhibición (mm)			
		Aceites esenciales			Extracto
		100%	50%	10%	25 mg/ml
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13.5 ± 0.71	13.25 ± 1.06	13 ± 1.41	13 ± 1.41
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente ATCC 33591	11.75 ± 0.35	11.5 ± 0	11.5 ± 0	14 ± 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15 ± 0	15 ± 0	14.5 ± 0.71	14 ± 2.83
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	12.5 ± 0.71	14 ± 1.41	13.5 ± 2.12	14.25 ± 1.77
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	12.5 ± 2.12	11.5 ± 2.12	11.5 ± 2.12	12.75 ± 0.35
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	16 ± 1.41	16 ± 1.41	13.75 ± 2.47	13.75 ± 0.35

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

Tabla 15. Actividad antibacteriana y antifúngica mediante el método de difusión en agar de aceites esenciales y extracto de *Piper callosum* Ruiz & Pav.

Microorganismos		Zona de Inhibición (mm)			
		Aceites esenciales			Extracto
		100%	50%	10%	25 mg/ml
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	16 ± 2.83	16.5 ± 0.71	15.5 ± 2.12	12.75 ± 1.06
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente ATCC 33591	14.25 ± 0.35	15 ± 0	13 ± 0	13.5 ± 0.71
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	20.5 ± 0.71	25.5 ± 7.78	17.5 ± 0.71	14.5 ± 0.71
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	13.5 ± 2.12	16.5 ± 3.54	14 ± 1.41	16 ± 1.41
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	16.75 ± 1.77	19 ± 4.24	16.75 ± 4.6	15.75 ± 0.35
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10.5 ± 0.71	12 ± 2.83	14.25 ± 0.35	13.25 ± 1.06

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

Tabla 16. Actividad antibacteriana y antifúngica mediante el método de difusión en agar de aceites esenciales y extracto de *Piper amalago* L.

Microorganismos		Zona de Inhibición (mm)			
		Aceites esenciales			Extracto
		100%	50%	10%	25 mg/ml
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15 ± 1.41	17.25 ± 1.77	14 ± 1.41	10 ± 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente ATCC 33591	15 ± 0	17.25 ± 0.35	12.5 ± 0	16 ± 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	17.5 ± 0.71	20.25 ± 1.77	15 ± 0	10.5 ± 0.71
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	12.5 ± 3.54	15 ± 1.41	13.5 ± 0.71	11.5 ± 2.12
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	15.5 ± 0.71	20.25 ± 5.3	13.25 ± 1.06	11 ± 0
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	11 ± 1.41	10 ± 0	10 ± 0
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10.5 ± 0.71	11.75 ± 2.47	14 ± 0	13.5 ± 0.71

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

Tabla 17. Actividad antibacteriana y antifúngica mediante el método de difusión en agar de los controles Ciprofloxacino y Ketoconazol.

Microorganismos		Zona de Inhibición (mm)	
		Ciprofloxacino 5µg/disco	Ketoconazol 2µg/mL
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	26.6 ± 0.57	N.A.
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente ATCC 33591	20 ± 0	N.A.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	32.5 ± 2.12	N.A.
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	40.5 ± 0.71	N.A.
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	30.5 ± 2.12	N.A.
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	39 ± 0	N.A.
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	43.67 ± 2.52	N.A.
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	N.A.	23.75 ± 1.06

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE, N.A: No aplica.

Tabla 18. Tabla comparativa de resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar.

	Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)										
		Aceites esenciales (50%)					Extracto (25 mg/mL)					
		<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.25 ± 1.77	13.25 ± 1.06	16.5 ± 0.71	17.25 ± 1.77	18 ± 0	13 ± 1.41	12.75 ± 1.06	10 ± 0	26.6 ± 0.57	N.A.	
	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente ATCC 33591	13.75 ± 1.06	11.5 ± 0	15 ± 0	17.25 ± 0.35	16 ± 0	14 ± 0	13.5 ± 0.71	16 ± 0	20 ± 0	N.A.	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	22 ± 5.66	15 ± 0	25.5 ± 7.78	20.25 ± 1.77	17 ± 0	14 ± 2.83	14.5 ± 0.71	10.5 ± 0.71	32.5 ± 2.12	N.A.	
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	12.5 ± 0.71	14 ± 1.41	16.5 ± 3.54	15 ± 1.41	24.5 ± 0.71	14.25 ± 1.77	16 ± 1.41	11.5 ± 2.12	40.5 ± 0.71	N.A.	
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	18.25 ± 2.47	11.5 ± 2.12	19 ± 4.24	20.25 ± 5.3	19 ± 0	12.75 ± 0.35	15.75 ± 0.35	11 ± 0	30.5 ± 2.12	N.A.	
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	39 ± 0	N.A.	
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	11 ± 1.41	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	43.67 ± 2.52	N.A.	
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	11.5 ± 2.12	16 ± 1.41	12 ± 2.83	11.75 ± 2.47	15.75 ± 3.18	13.75 ± 0.35	13.25 ± 1.06	13.5 ± 0.71	N.A.	23.75 ± 1.06	

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

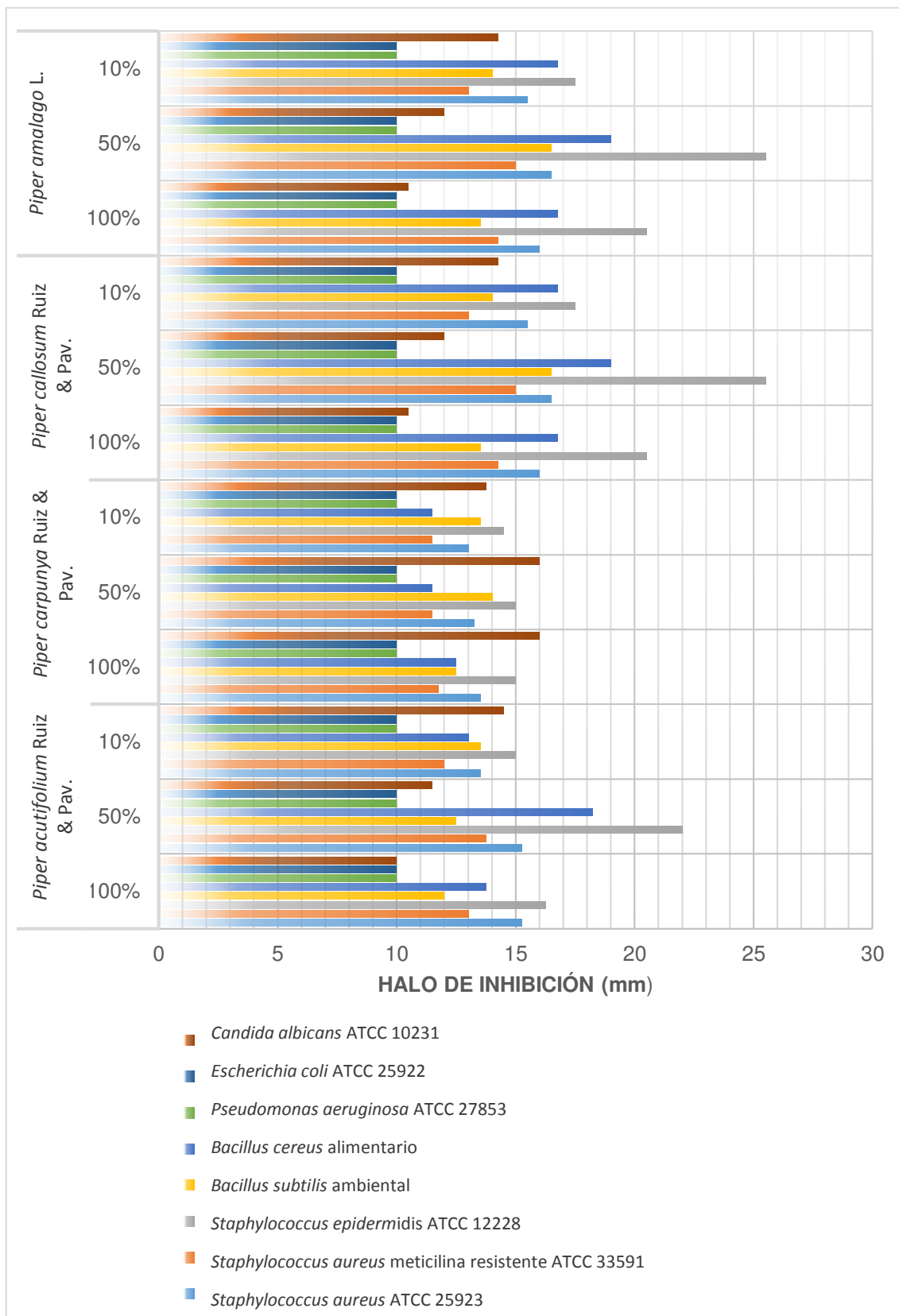


Figura 14. Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las especies en estudio por el método de difusión en agar.

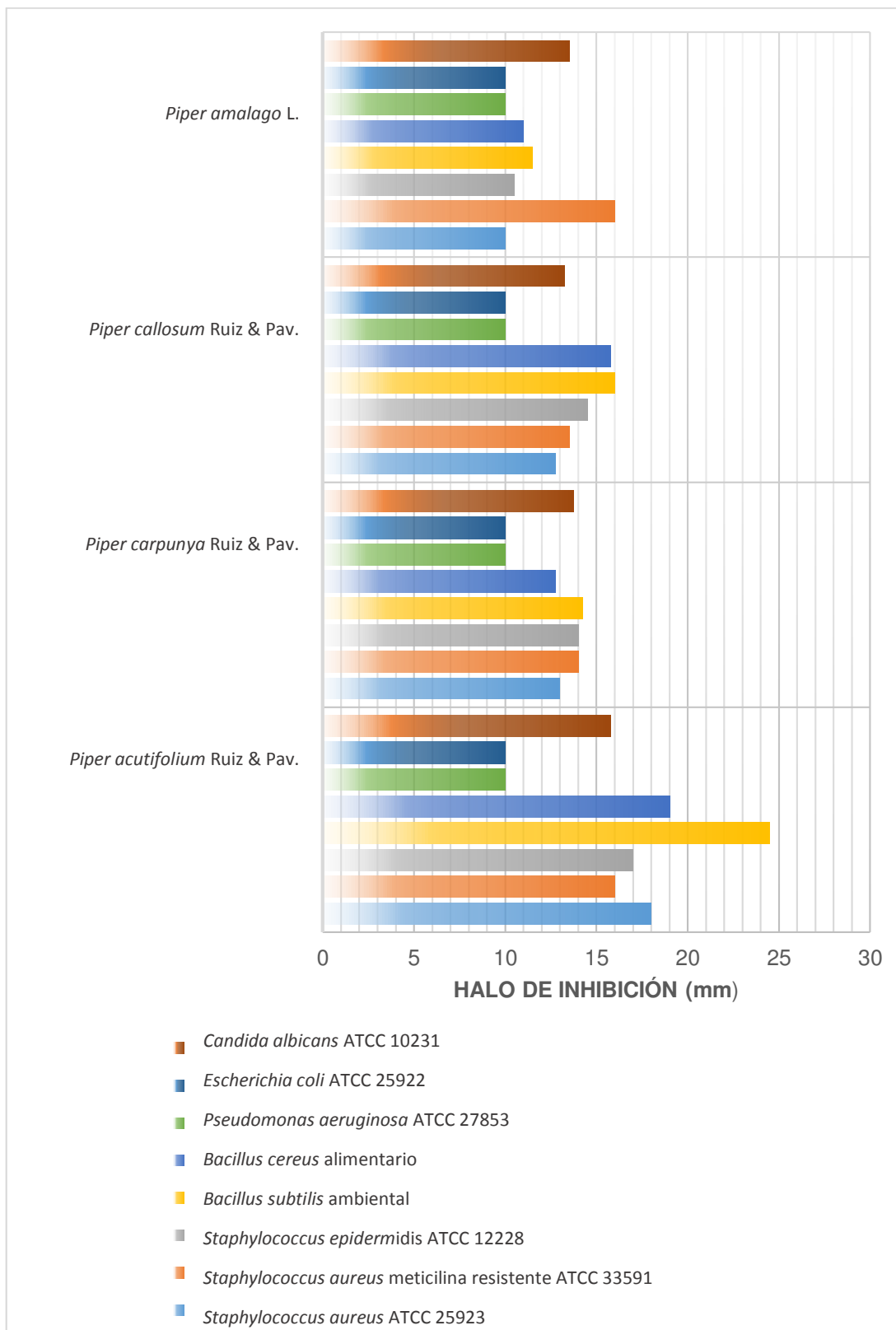


Figura 15. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las especies en estudio por el método de difusión en agar.

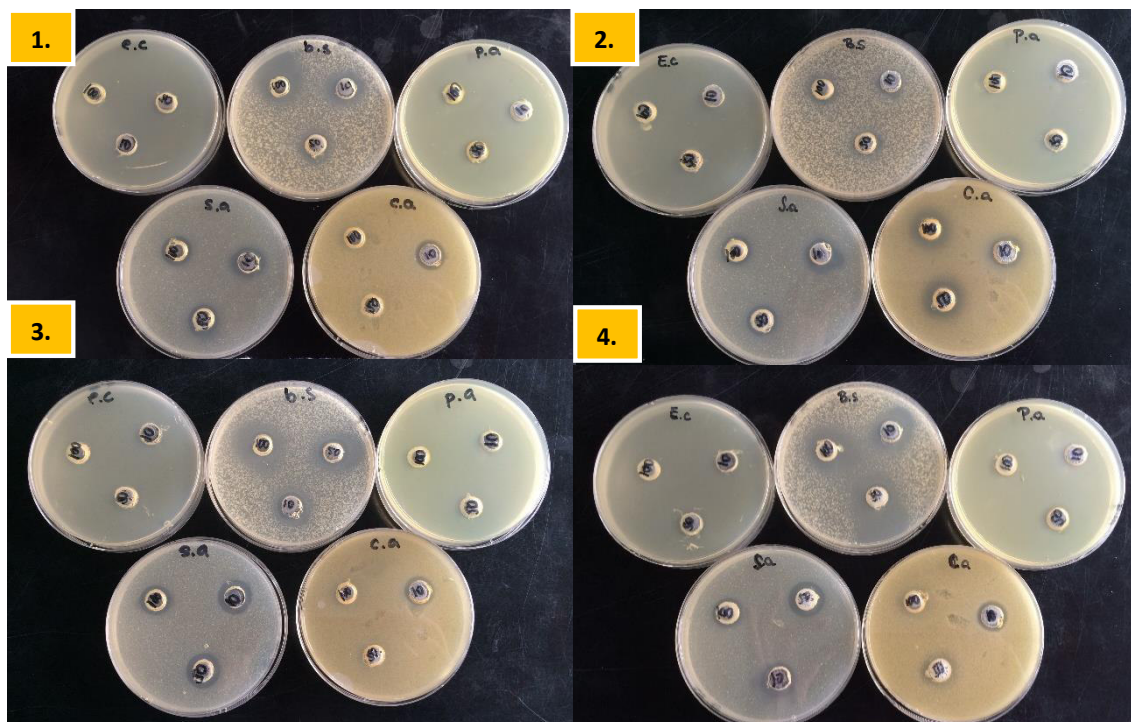


Figura 16. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las especies en estudio a las concentraciones de 100%, 50% y 10% por el método de difusión en agar contra cinco microorganismos.

Leyenda: E.c (*Escherichia coli* ATCC 25922), B.s (*Bacillus subtilis* ambiental), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), C.a (*Candida albicans* ATCC 10231).

- 1. Aceite esencial de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- 2. Aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- 3. Aceite esencial de *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- 4. Aceite esencial de *Piper amalago* L.

Las concentraciones en las placas están distribuidas de la siguiente manera: La concentración de 100% se encuentra en el extremo superior izquierdo, la de 10% en el extremo superior derecho y la concentración del 50% debajo de ellas.

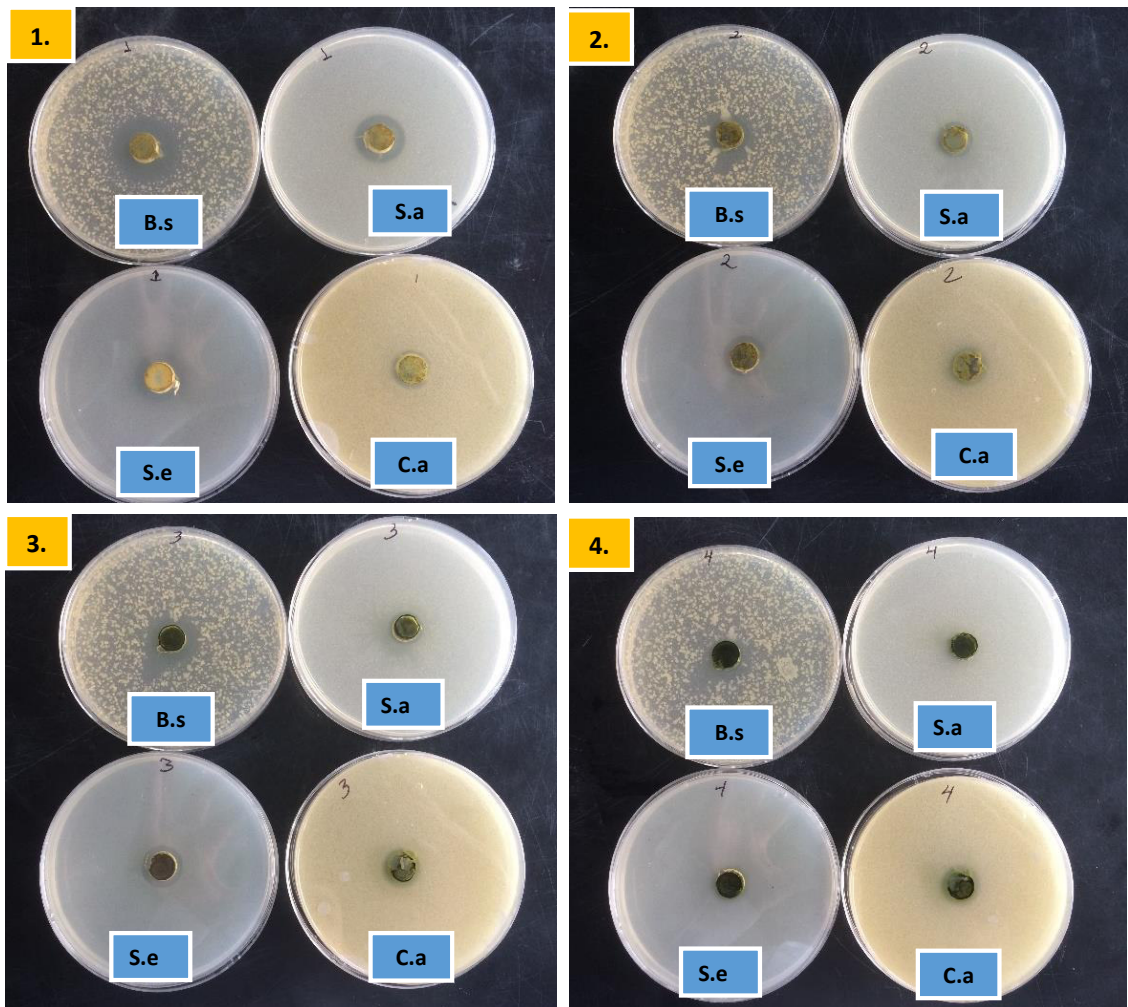


Figura 17. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las especies en estudio a la concentración de 25 mg/mL por el método de difusión en agar contra cuatro microorganismos.

Leyenda: B.s (*Bacillus subtilis* ambiental), S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), S.e (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), C.a (*Candida albicans* ATCC 10231).

- 1. Extracto etanólico de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- 2. Extracto etanólico de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- 3. Extracto etanólico de *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- 4. Extracto etanólico de *Piper amalago* L.

4.3.2 CMI por el método de microdilución colorimétrica en microplaca

Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta los parámetros de De Lima E. Se consideró que los aceites esenciales y extractos etanólicos tenían una actividad antimicrobiana cuando el CMI $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$ ⁽⁸⁴⁾.

Los resultados de la determinación de la CMI por el método de microdilución colorimétrica de los aceites esenciales y extractos etanólicos en estudio se presentan en las Tablas 19-22 y las Figuras 18-22.

Tabla 19. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de aceites de las especies en estudio sobre ocho microorganismos.

Microorganismos		Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{L/mL}$)			
		Aceites esenciales			
		<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.16 \pm 0	0.26 \pm 0.09	0.21 \pm 0.09	0.16 \pm 0
	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente ATCC 33591	0.12 \pm 0.06	0.16 \pm 0	0.12 \pm 0.06	0.16 \pm 0
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	0.12 \pm 0.06	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0	0.16 \pm 0
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>40	>40	>40	>40
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>40	>40	>40	>40
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	3.16 \pm 4.02	0.82 \pm 1.12	0.31 \pm 0	2.81 \pm 3.09

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. \pm DE.

Tabla 20. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de las especies en estudio sobre ocho microorganismos.

Microorganismos		Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)			
		Extractos			
		<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpunya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15.63 ± 0	52.08 ± 18.04	26.04 ± 9.02	>250
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente ATCC 33591	23.44 ± 11.05	9.77 ± 8.29	15.63 ± 0	5.86 ± 2.76
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	31.25 ± 0	145.83 ± 95.47	57.29 ± 59.16	>250
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	15.63 ± 0	78.13 ± 66.29	15.63 ± 0	15.63 ± 0
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	7.81 ± 0	31.25 ± 0	15.63 ± 0	15.63 ± 0
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>250	>250	>250	>250
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>250	>250	>250	>250
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>250	>250	187.5 ± 88.39	>250

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

Tabla 21. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de los controles Ketoconazol y Ciprofloxacino sobre ocho microorganismos.

Microorganismos		Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)	
		Ciprofloxacino	Ketoconazol
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1.33 ± 0.58	N.A
	<i>Staphylococcus aureus</i> metilina resistente ATCC 33591	1.5 ± 0.71	N.A
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0.13 ± 0	N.A
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	0.19 ± 0.09	N.A
	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	1.25 ± 1.06	N.A
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12 ± 5.66	N.A
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.06 ± 1.33	N.A
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	N.A	1 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE, N.A: No aplica.

Tabla 22. Tabla comparativa de resultados obtenidos en la prueba de microdilución colorimétrica.

	Microorganismos	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL)											
		Aceites esenciales						Extractos					
		<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpubya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpubya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.	<i>Piper acutifolium</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper carpubya</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper callosum</i> Ruiz & Pav.	<i>Piper amalago</i> L.
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.13 ± 0	0.23 ± 0.08	0.17 ± 0.07	0.13 ± 0	15.63 ± 0	52.08 ± 18.04	26.04 ± 9.02	>250	1.33 ± 0.58	N.A		
	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente ATCC 33591	0.1 ± 0.05	0.14 ± 0	0.1 ± 0.05	0.13 ± 0	23.44 ± 11.05	9.77 ± 8.29	15.63 ± 0	5.86 ± 2.76	1.5 ± 0.71	N.A		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0.13 ± 0	0.14 ± 0	0.13 ± 0	0.13 ± 0	31.25 ± 0	145.83 ± 95.47	57.29 ± 59.16	>250	0.13 ± 0	N.A		
	<i>Bacillus subtilis</i> ambiental	0.1 ± 0.05	0.14 ± 0	0.13 ± 0	0.13 ± 0	15.63 ± 0	78.13 ± 66.29	15.63 ± 0	15.63 ± 0	0.19 ± 0.09	N.A		
Bacterias Gram (-)	<i>Bacillus cereus</i> alimentario	0.13 ± 0	0.14 ± 0	0.13 ± 0	0.13 ± 0	7.81 ± 0	31.25 ± 0	15.63 ± 0	15.63 ± 0	1.25 ± 1.06	N.A		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 40	> 40	> 40	> 40	>250	>250	>250	>250	12 ± 5.66	N.A		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 40	> 40	> 40	> 40	>250	>250	>250	>250	1.06 ± 1.33	N.A		
Hongo	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2.54 ± 3.22	0.71 ± 0.98	0.25 ± 0	2.23 ± 2.46	>250	>250	187.5 ± 88.39	>250	N.A	1 ± 0		

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

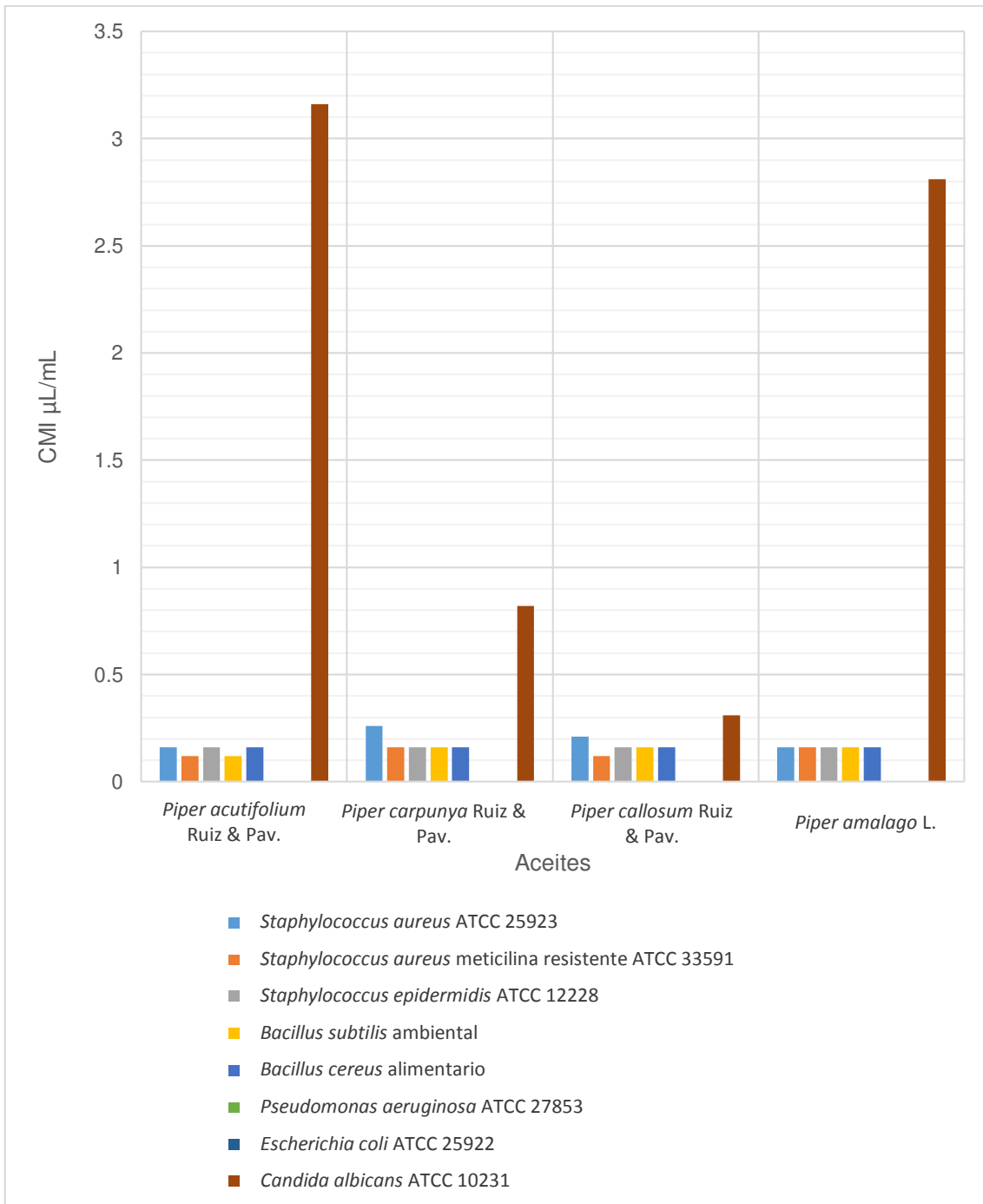


Figura 18. Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de las especies en estudio.

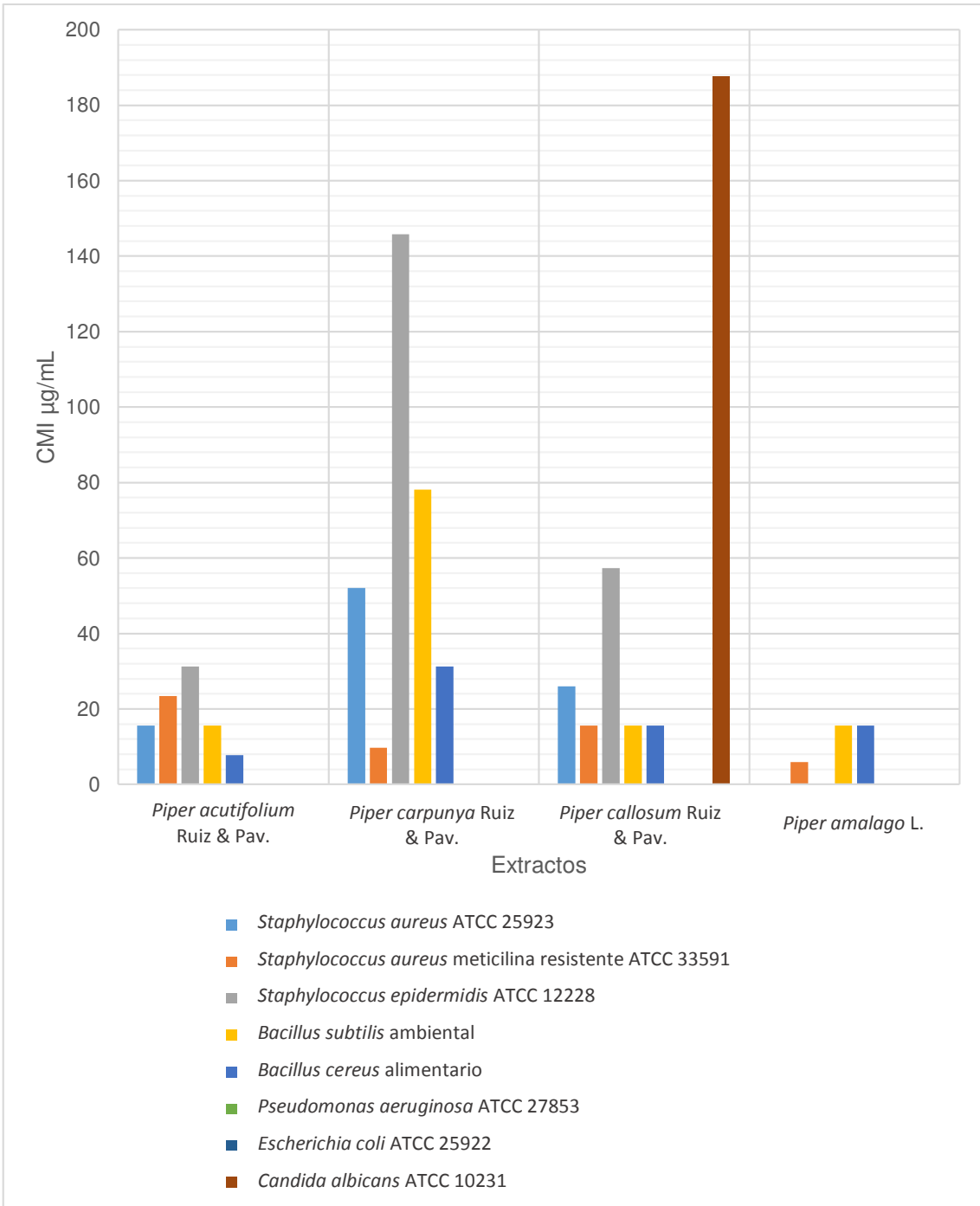


Figura 19. Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos etanólicos de las especies en estudio.

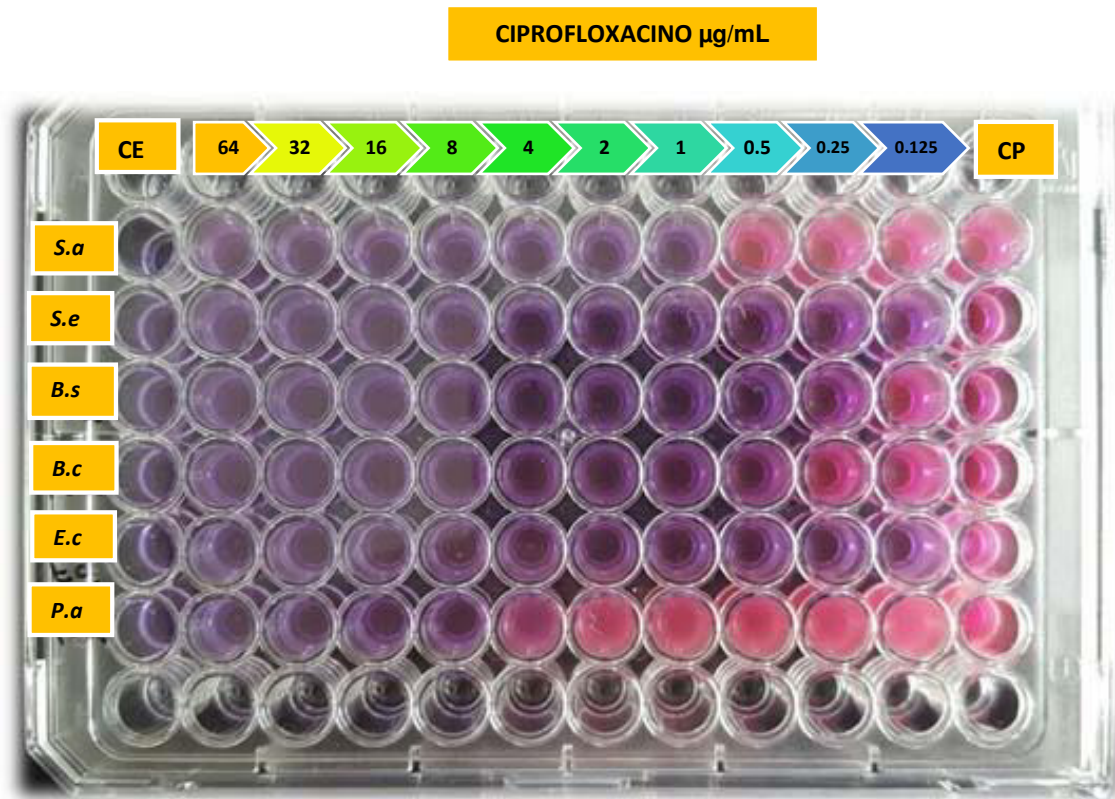


Figura 20. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del control Ciprofloxacino por el método de microdilución colorimétrica contra seis microorganismos.

Leyenda: CE (Control de esterilidad), CP (Control Positivo), S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), S.e (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), B.s (*Bacillus subtilis* ambiental), B.c (*Bacillus cereus* alimenticio), E.c (*Escherichia coli* ATCC 25922), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10231).

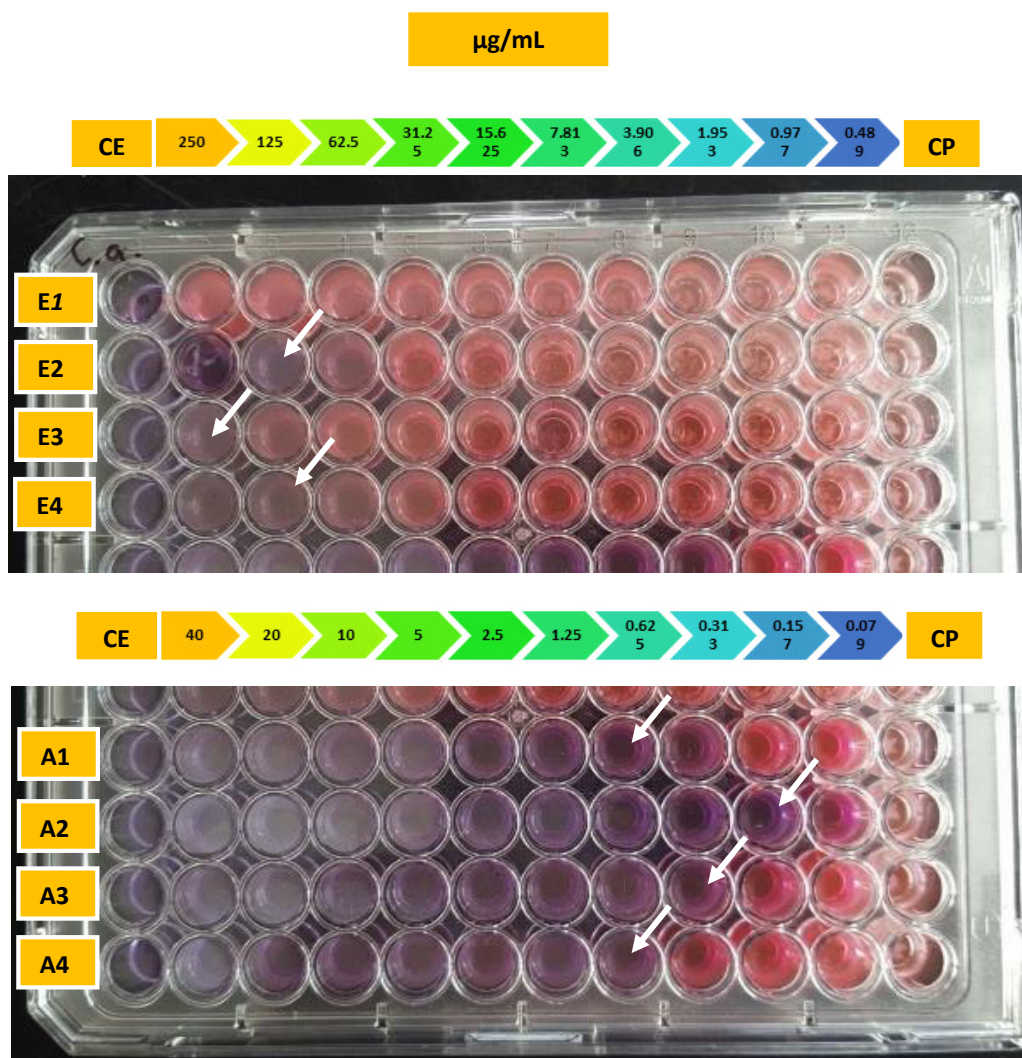


Figura 21. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de aceites esenciales y extractos etanólicos de hojas de las especies en estudio contra *Candida albicans*.

Leyenda:

- E1. Extracto de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- E2. Extracto de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- E3. Extracto de *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- E4. Extracto de *Piper amalago* L.
- A1. Aceite esencial de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.
- A2. Aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav.
- A3. Aceite esencial de *Piper callosum* Ruiz & Pav.
- A4. Aceite esencial de *Piper amalago* L.

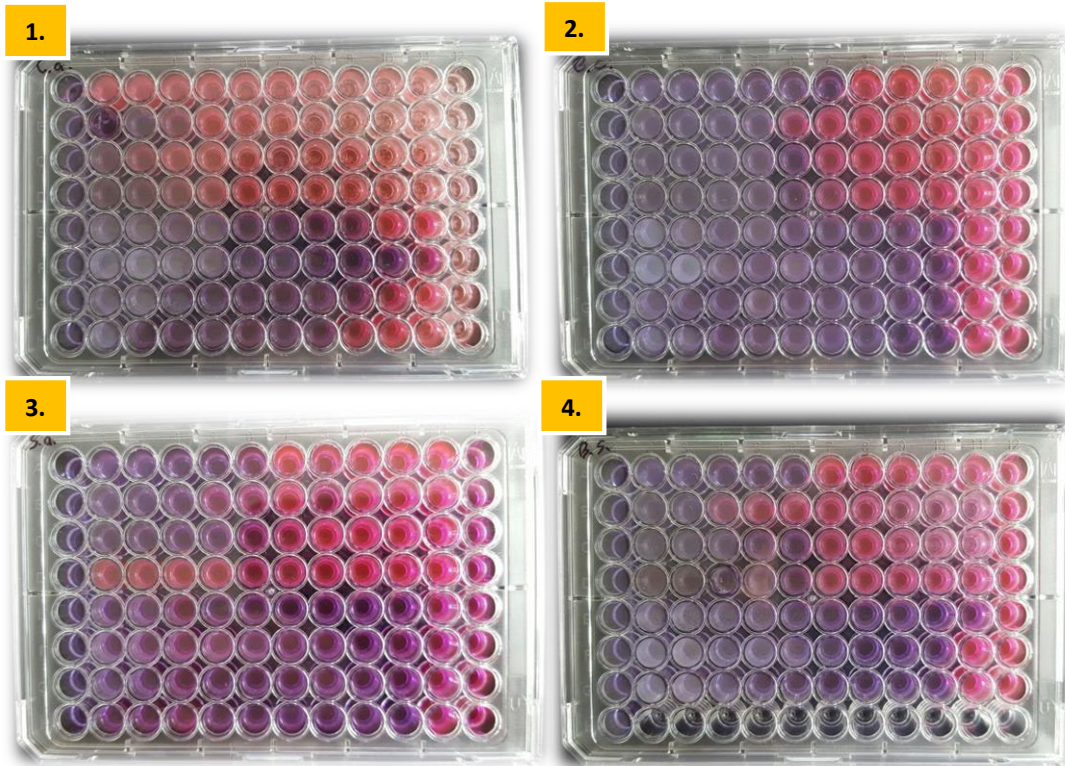


Figura 22. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de aceites esenciales y extractos etanólicos de hojas de las especies en estudio por el método de microdilución colorimétrica contra cuatro microorganismos.

Leyenda:

- 1. *Candida albicans* ATCC 10231
- 2. *Bacillus cereus* cepa alimentaria
- 3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 4. *Bacillus subtilis* cepa ambiental

4.1 Cromatografía de gases/ espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales

Las Tablas 23-26 muestran los resultados de la elucidación estructural de los componentes de los aceites esenciales (Anexos 7-10):

Tabla 23. Elucidación estructural de los componentes del aceite esencial extraído de hojas de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. por el método de CG/EM.

N°	Compuesto	RT*
1	1,7-Octadiyne	1.28
2	Ylangene	2.06
3	Copaene	2.52
4	α -Caryophyllene	2.56
5	δ -Neoclovene	2.66
6	12-Hydroxy-14-methyl-oxa-cyclotetradec-6-en-2-one	3.07
7	(+)-Longifolene	3.17
8	Apiol	3.36
9	Limonene oxide, trans-	3.73
10	1,9-Decadiyne	3.97
11	Tropenol	4.11
12	Limonene	4.23
13	β -Pinene	4.30
14	Caryophyllene	7.74

Leyenda: RT = Tiempo de Retención: tiempo característico que necesita cada compuesto de la mezcla química para pasar a través del sistema, bajo las condiciones establecidas

Tabla 24. Elucidación estructural de los componentes del aceite esencial extraído de hojas de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. por el método de CG/EM.

N°	Compuesto	RT*
1	2-Oxobicyclo[2.2.1]heptane-1-carbonitrile	1.12
2	1R- α -Pinene	1.14
3	β -Pinene	1.28
4	β -Santanol acetate	1.30
5	m-Cymene	1.42
6	trans-4-Thujanol	1.45
7	Safrole	1.72
8	Methyl eugenol	2.13
9	9-Borabicyclo[3.3.1]nonane, 9-cyclooctyl-	2.59
10	cis-Asarone	2.73
11	Isosafrol	2.92
12	Spathulenol	2.95
13	Asarone	3.15
14	α -Cubebene	3.36
15	Copaene	3.58
16	Methyl isoeugenol	4.50
17	τ -Elemene	4.57
18	Cadina-3,9-diene (β -Cadina)	4.72
19	Elemicin	4.93
20	(-)-Spathulenol	5.24
21	Eudesm-7(11)-en-4-ol	5.32
22	5,6-Dimethoxybenzimidazole	8.15
23	α -Copaen-11-ol	8.85

Leyenda: RT = Tiempo de Retención: tiempo característico que necesita cada compuesto de la mezcla química para pasar a través del sistema, bajo las condiciones establecidas

Tabla 25. Elucidación estructural de los componentes del aceite esencial extraído de hojas de *Piper callosum* Ruiz & Pav. por el método de CG/EM.

N°	Compuesto	RT*
1	4-Methoxy-2-methylaniline	1.02
2	11-Dodecenol	1.06
3	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan-9-amine, dimer	1.09
4	1R- α -Pinene	1.14
5	Camphene	1.19
6	2(10)-Pinene	1.28
7	β -Linalool	1.71
8	Borneol	2.13
9	1,4-Methanoazulene	2.56
10	Bornyl acetate	2.88
11	Safrol	2.92
12	Copaene	3.58
13	α -Pinene	3.73
14	α -Gurjunene	3.85
15	ρ -Menth-8-en-1-ol	3.87
16	Caryophyllene	3.96
17	τ -Muurolene	4.01
18	Azulene	4.06
19	Humulen-(v1)	4.18
20	α -Cubebene	4.42
21	D-Limonene	4.52
22	Isocaryophyllene	4.59
23	Eudesma-3,7(11)-diene	4.72
24	Spathulenol	5.18
25	Caryophyllene oxide	5.25
26	Guaiene	5.32
27	Eudesm-7(11)-en-4-ol	5.80
28	(-)-Spathulenol	5.90
29	Longifolenaldehyde	6.29
30	Phytol	8.99

Leyenda: RT = Tiempo de Retención: tiempo característico que necesita cada compuesto de la mezcla química para pasar a través del sistema, bajo las condiciones establecidas

Tabla 26. Elucidación estructural de los componentes del aceite esencial extraído de hojas de *Piper amalago* L. por el método de CG/EM.

N°	Compuesto	RT*
1	2-methyl-p-anisidine	1.01
2	1R- α -Pinene	1.14
3	3-Carene	1.16
4	β -Pinene	1.28
5	α -Phellandrene	1.36
6	β -Phellandrene	1.47
7	N-Methyl-p-anisidine	1.89
8	(+)-Longifolene	2.59
9	δ -Neoclovene	2.66
10	Copaene	3.19
11	Ylangene	3.29
12	α -Cubebene	3.38
13	Caryophyllene	3.70
14	Germacrene D	4.43
15	D-Limonene	4.53
16	τ -Elemene	4.57
17	(+)-Ledene	4.57
18	Cadina-1(10),4-diene	4.74
19	(-)-Spathulenol	5.20
20	Globulol	5.32
21	Santalol, E-cis, epi- β -	8.28

Leyenda: RT = Tiempo de Retención: tiempo característico que necesita cada compuesto de la mezcla química para pasar a través del sistema, bajo las condiciones establecidas

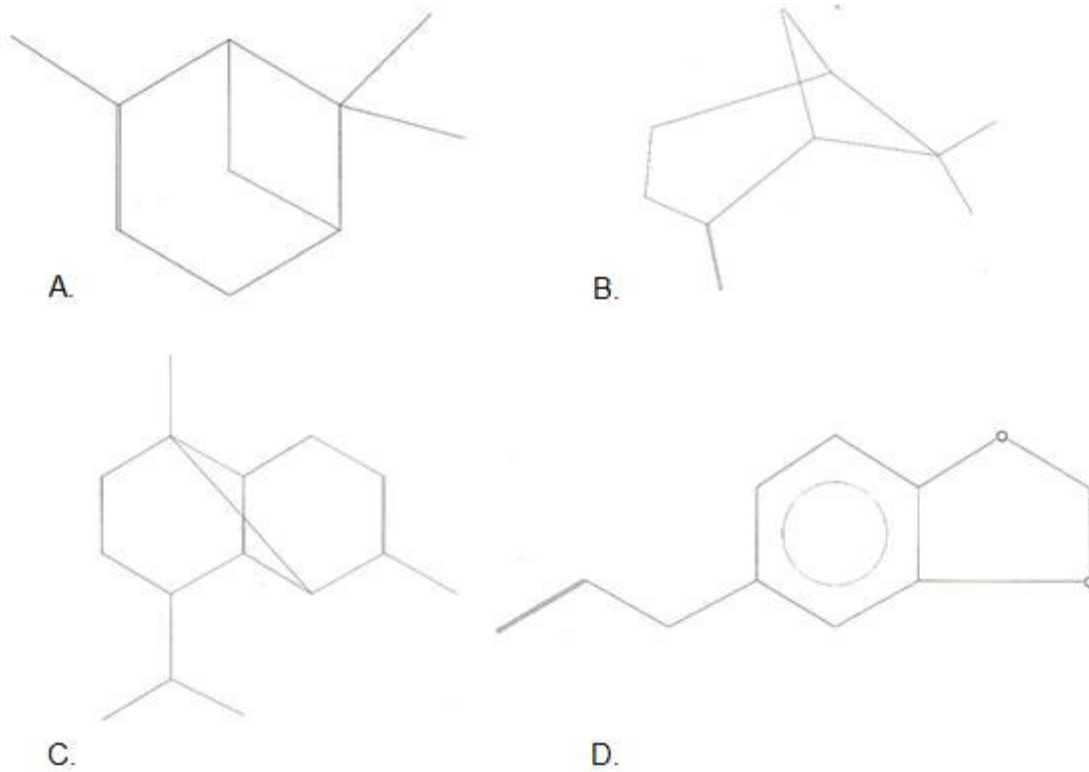


Figura 23. Estructuras frecuentes entre los componentes elucidados.

Leyenda: A: 1R- α -Pinene, B: β -Pinene, C: Copaene, D: Safrole

V DISCUSIÓN

Se demostró que el aceite esencial y extracto de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. presentaron **actividad antimicrobiana** significativa frente a las bacterias Gram positivas en estudio. El aceite esencial a la concentración de 50% inhibió el crecimiento de *Bacillus cereus* (18.25 ± 2.47 mm) y *Staphylococcus epidermidis* (22 ± 5.66 mm), mientras que el extracto etanólico inhibió el crecimiento de *Bacillus cereus* (19 ± 0 mm), *Bacillus subtilis* (24.5 ± 0.71 mm) y *Staphylococcus aureus* (18 ± 0 mm). Ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto estudiados presentaron actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Tabla 13). Por lo tanto se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por De la Cruz J., quién realizó un estudio sobre la actividad antimicrobiana, antioxidante y composición química de aceites esenciales de 3 especies nativas del Perú, entre las que destaca *Piper acutifolium*. Sus resultados de la prueba de difusión mostraron una actividad significativa de los aceites a las concentraciones de 50% (20 mm) y 75% (23 mm) frente a *Staphylococcus aureus* y sensibilidad del aceite al 75% (16 mm) frente a *Bacillus subtilis*, mientras que ninguna concentración mostró actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* ⁽⁸⁵⁾. Los resultados obtenidos en el presente estudio también son similares a los obtenidos por Salleh et al. quien realizó un estudio sobre la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper arborescens* Roxb., cuyos resultados, tanto del aceite esencial obtenido del tallo como del aceite obtenido de las hojas, revelaron que la especie estudiada no inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, además el aceite de hojas mostró actividad frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ⁽⁸⁶⁾.

En relación a la Concentración Mínima Inhibitoria, el aceite esencial de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. presentó buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas en estudio, excepto *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por ejemplo, frente a *Staphylococcus aureus* presentó una CMI de 0.16 ± 0 µL/mL

(Tabla 19), equivalente a $0.13 \times 10^{-3} \pm 0$ mg/mL, este resultado es bastante menor al obtenido por De la Cruz J., quien determinó una CMI de 97.83 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ⁽⁸⁵⁾. El extracto etanólico de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. presentó buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas en estudio excepto *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Tabla 20). En el estudio realizado por Ruiz J., quien determinó la CMI del extracto etanólico de *Piper spp.* (*Piper acutifolium*) se obtuvo una débil actividad con una CMI de 500 µg/mL frente a *Candida albicans* ⁽⁷⁷⁾. En el presente estudio, la mayor concentración probada fue de 250 µg/mL, lo cual podría explicar el por qué no se presentó inhibición del crecimiento microbiano.

El aceite esencial y extracto etanólico de ***Piper carpunya* Ruiz & Pav.** presentaron halos de inhibición entre 13 y 16 mm frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* (Tabla 14). De la Cruz J. también demostró que el aceite esencial a las concentraciones de 10%, 50% y 75% de esta planta presentó ligera sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* ⁽⁸⁵⁾. En cuanto al extracto etanólico, los resultados pueden ser comparados con los obtenidos por Ruiz J. y Roque M. quienes realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de *Piper lineatum* y obtuvieron buena actividad del extracto etanólico frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans* con halos de 20 mm, 18 mm y 22 mm respectivamente ⁽⁸⁷⁾. En el presente estudio ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico estudiados presentaron actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Otros estudios similares demostraron la inactividad de los extractos y aceites esenciales de esta especie vegetal frente a las mismas cepas ^(85,88,89).

En relación a la Concentración Mínima Inhibitoria, el aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. presentó buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas en estudio excepto *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por ejemplo, frente a *Candida albicans* presentó actividad antimicrobiana a una CMI

de $0.82 \pm 1.12 \mu\text{L/mL}$ (Tabla 19), esta actividad es sumamente superior a la obtenida por De la Cruz J. quien obtuvo una CMI de $6.25 \mu\text{L/mL}$ frente a *Candida albicans* utilizando el método de dilución en agar ⁽⁸⁵⁾. Rath C. y Mohapatra S. realizaron un estudio sobre la caracterización de la susceptibilidad de *Candida spp.* de cuatro aceites esenciales. El aceite esencial extraído de hojas de *Piper betle* mostró moderada actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* con una CMI de $250 \mu\text{L/mL}$ ⁽⁹⁰⁾, una actividad menor a la determinada en el presente estudio. El extracto etanólico de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. presentó buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas en estudio excepto *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Tabla 20).

Se demostró que el aceite esencial de ***Piper callosum* Ruiz & Pav.** presentó actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus* ya que a la concentración de 50% obtuvo halos de inhibición de $25.5 \pm 7.78 \text{ mm}$ y $19 \pm 4.24 \text{ mm}$ respectivamente, mientras que al 100% inhibió el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* ($20.5 \pm 0.71 \text{ mm}$). Ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico estudiados presentaron actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. El extracto etanólico de esta especie no presentó actividad significativa frente a las cepas estudiadas; sin embargo, presentó sensibilidad ante las cepas *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* con halos de $15.75 \pm 0.35 \text{ mm}$ y $16 \pm 1.41 \text{ mm}$ respectivamente (Tabla 15). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Ahmad et al. quien evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Piper nigrum* L. Por el método de difusión en agar obtuvo halos de 23.6 mm contra *Bacillus cereus* y de 23.5 mm contra *Bacillus subtilis* ⁽⁹¹⁾. Esto demuestra la variabilidad de la actividad antimicrobiana entre las diferentes especies del género *Piper*.

En relación a la Concentración Mínima Inhibitoria, el aceite esencial y el extracto etanólico de *Piper callosum* Ruiz & Pav. presentaron buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas en estudio excepto *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tablas 19 y 20). Por ejemplo, se obtuvo una CMI de

0.13 ± 0 µg/mL para el aceite esencial frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* y una CMI de 0.25 ± 0 µg/mL frente a *Candida albicans*. El resultado obtenido en el presente estudio es mayor al determinado por Morales et al. quien evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper hispidum* Sw. y obtuvo una CMI de 12.5 - 6.25 µg/mL frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* y una CMI de 200 - 100 µg/mL frente a *Candida albicans* ⁽⁹²⁾. El extracto etanólico de *Piper callosum* Ruiz & Pav. demostró moderada actividad con una CMI de 187.5 ± 88.39 µg/mL frente a *Candida albicans*. En otro estudio realizado por Regasini et al. se determinó la CMI de diferentes extractos de *Piper arboreum* y *Piper tuberculatum* frente a levaduras oportunistas mediante la prueba de microdilución en placa. Sus resultados mostraron una moderada actividad de los extractos etanólicos de frutos y hojas de las especies mencionadas frente a *Candida albicans*, mientras que los extractos obtenidos de ramas y aquellos extractos a base de los solventes hexano, hidrometanol y etil acetato no presentaron actividad alguna ⁽⁹³⁾.

Se demostró que el aceite esencial de ***Piper amalago* L.** presentó actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus* ya que a una concentración del 50% obtuvo halos de 20.25 ± 1.77 mm y 20.25 ± 5.3 mm respectivamente. Además el aceite esencial al 50% y el extracto etanólico poseen sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente con halos de 17.25 ± 0.35 mm y 16 ± 0 mm respectivamente. Destacó también la sensibilidad del aceite esencial al 50% frente a *Staphylococcus aureus* (17.25 ± 1.77 mm). Ninguna de las concentraciones de aceite esencial y extracto etanólico estudiados presentaron actividad significativa frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Tabla 16). Estos resultados de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar son los primeros reportados, por lo que podríamos compararlos con estudios similares realizados en otras especies del género *Piper* como el realizado por Fernandez et al. quien determinó la actividad antimicrobiana de un extracto metanólico de hojas de *Piper sarmentosum* frente a diversos microorganismos. Obtuvo una actividad

inferior en comparación con el presente estudio frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente y no presentó actividad frente a *Escherichia coli* ⁽⁹⁴⁾.

En relación a la Concentración Mínima Inhibitoria, el aceite esencial de *Piper amalago* L. presentó buena actividad antimicrobiana frente a todas las cepas en estudio excepto *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto etanólico de *Piper amalago* L. presentó buena actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (5.86 ± 2.76 $\mu\text{g/mL}$), *Bacillus subtilis* (15.63 ± 0 $\mu\text{g/mL}$) y *Bacillus cereus* (15.63 ± 0 $\mu\text{g/mL}$) (Tabla 20). La CMI frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistente es menor a la que obtuvo Valle et al. quien evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Piper betle* L. y demostró que su extracto etanólico posee una actividad moderada con una CMI de 156 $\mu\text{g/mL}$ ⁽⁹⁵⁾.

En resumen, los resultados de la prueba de difusión en agar demostraron que el aceite esencial de *Piper callosum* Ruiz & Pav. al 50% y el extracto etanólico de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. tuvieron mayor actividad antimicrobiana que los demás aceites y extractos en estudio, con halos de 25.5 ± 7.78 mm frente a *Staphylococcus epidermidis* y 24.5 ± 0.71 mm frente a *Bacillus subtilis* respectivamente (Tabla 18). En relación al método de microdilución, los mejores resultados de los aceites esenciales fueron los obtenidos de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. y *Piper callosum* Ruiz & Pav., porque presentaron la mayor efectividad en la inhibición de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente representando el 1250% de la CMI del control positivo Ciprofloxacino, y el de *Piper callosum* Ruiz & Pav. porque representó el 322.58% de la CMI del control positivo Ketoconazol. En relación a los mejores resultados de la CMI de los extractos, el obtenido de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. representó el 16% de la CMI del Ciprofloxacino frente a *Bacillus cereus* y el único resultado obtenido de *Piper callosum* Ruiz & Pav. representó el 0.53% de la CMI del Ketoconazol. La variabilidad de los resultados de la actividad antimicrobiana obtenida puede deberse a la naturaleza de los antimicrobianos, aceites y extractos utilizados en el presente estudio ya que los controles positivos son patrones secundarios

altamente concentrados y purificados, mientras que los aceites y extractos son una mezcla de componentes fitoquímicos no purificados que pueden interactuar individualmente, en sinergismo o antagonismo. Por otro lado, la CMI de los aceites esenciales y los extractos etanólicos de las especies en estudio evidenció la presencia de actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*, mientras que no se obtuvo actividad frente a las Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Tabla 22). Se obtuvo mejores resultados que los reportados en otros estudios con diferentes especies del género *Piper* como el realizado por Salleh et al. quien determinó la actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Piper porphyrophyllum* cuyo aceite esencial de hojas mostró una CMI de 125 µg/mL frente a *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ⁽⁹⁶⁾; Salleh et al. evaluó la actividad antimicrobiana de *Piper arborescens* Roxb. cuyo aceite esencial de hojas mostró una CMI de 250 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y de 500 µg/mL frente a *Bacillus subtilis* ⁽⁸⁶⁾; Silva et al. evaluó la actividad antimicrobiana de *Piper ovatum* cuyo extracto hidroalcohólico de raíz y hojas presentó una CMI de 250 µg/mL contra *Bacillus subtilis* ⁽⁵⁾; Steenkamp et al. determinó la actividad antibacteriana de *Piper capense* L.f cuyo extracto metanólico mostró una CMI de 520 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* ⁽⁹⁷⁾. De acuerdo a lo citado anteriormente, todos los aceites esenciales y extractos etanólicos de las especies estudiadas no demostraron actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Esto contrasta con múltiples estudios realizados con otras especies del género *Piper*, como los hechos con *Piper porphyrophyllum* ⁽⁹⁶⁾, *Piper hymenophyllum* ⁽⁹⁸⁾ y *Piper officinarum* ⁽⁹⁹⁾ que demostraron actividad frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que los realizados con *Piper aduncum* ⁽¹⁰⁰⁾, *Piper interruptum*, *Piper longum*, *Piper sarmentosum* ⁽⁸⁸⁾, *Piper arborescens* Roxb. ⁽⁸⁶⁾ y *Piper ovatum* ⁽⁵⁾ no demostraron actividad frente a *Escherichia coli*. Esto demuestra la variabilidad de la actividad antimicrobiana entre las diferentes especies del género *Piper*.

Múltiples estudios adicionales reportaron que las bacterias Gram positivas pueden ser más susceptibles que las bacterias Gram negativas ^(86,99-102). Se conoce que el rasgo distintivo de las bacterias Gram negativas es la presencia de una doble membrana que las rodea. Aunque todas las bacterias tienen una membrana celular interna, las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa que las caracteriza que restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través de su revestimiento de lipopolisacáridos. Las bacterias Gram positivas al no tener membrana externa son más susceptibles a la penetración de ciertas drogas y antibióticos, lo que podría explicar por qué las bacterias Gram negativas son generalmente más resistentes a los antibióticos que las Gram positivas ⁽¹⁰³⁾, como lo observado en el presente estudio.

Los resultados de los análisis de actividad antimicrobiana para aceites esenciales y extractos etanólicos presentaron diferencias entre los métodos utilizados; la evaluación por el método de microdilución colorimétrica mostró mayor inhibición que el método de difusión en agar, como en otros estudios ^(61,88,104), debido a que la alta volatilidad de los aceites esenciales causa que algunos componentes químicos se evaporen durante la incubación; además su hidrofobicidad impide la difusión de todos los componentes del mismo ⁽¹⁰⁴⁾.

El **análisis fitoquímico preliminar** de los extractos etanólicos investigados mostró la abundancia de flavonoides y la presencia de antraquinonas, taninos, compuestos fenólicos, triterpenoides y esteroides. En relación a la abundancia de los metabolitos secundarios encontrados destaca la presencia de flavonoides en *Piper acutifolium* Ruiz & Pav., antraquinonas en *Piper amalago* L., compuestos fenólicos en *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. y *Piper carpunya* Ruiz & Pav. y triterpenoides y esteroides en *Piper carpunya* Ruiz & Pav. Estos resultados coinciden con lo reportado en otros trabajos de investigación fitoquímica realizados con otras especies del género *Piper* ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁹⁾. Se le puede atribuir la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos del presente estudio a los flavonoides, taninos y triterpenoides. Los principales tipos de flavonoides han sido relacionados con la actividad antifúngica y antibacteriana

de diferentes extractos del género *Piper* ⁽¹¹⁰⁾. También se ha demostrado la toxicidad de los taninos frente a hongos filamentosos, levaduras y bacterias, y la actividad de los terpenoides frente a bacterias, hongos, virus y protozoarios ⁽⁶⁾.

Respecto a la **elucidación estructural** del aceite esencial de *Piper acutifolium* **Ruiz & Pav.**, se determinó 14 compuestos (Tabla 23). Los sesquiterpenos representaron el 50%, seguidos de los monoterpenos con un 21.43%, en su mayoría hidrocarburos monoterpénicos, los hidrocarburos no oxigenados representaron el 14.29% mientras que un derivado del fenilpropano y un alcaloide el 7.14% respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con los reportados por De la Cruz J. quien elucidó los componentes del aceite esencial de *Piper acutifolium* en donde los fenilpropanoides representaron el 42.45%, los monoterpenos el 36.21% y los sesquiterpenos un 15.42%. A diferencia del presente estudio, De la Cruz J. reportó que los monoterpenos oxigenados fueron más abundantes que los monoterpenos hidrocarburos ⁽⁸⁵⁾. Lognay et al. realizó un estudio acerca de la composición química por GC capilar y GC/MS del aceite esencial de hojas secas de *Piper acutifolium*. Entre los principales constituyentes identificados destacó la presencia mayoritaria de sesquiterpenos al igual que en el presente estudio, teniendo como componente común copaene, un sesquiterpeno tricíclico ⁽¹¹¹⁾. Otros estudios realizados en aceites esenciales de especies vegetales del género *Piper* mencionan al copaene como un ingrediente mayoritario como ocurre con los aceites de *Piper boehmeriaefolium* ⁽¹¹²⁾, *Piper porphyrophyllum* ⁽⁹⁶⁾, *Piper ovatum* ⁽⁵⁾, *Piper lanceaefolium* ⁽¹¹³⁾, *Piper hispidum* ⁽⁹²⁾ y *Piper regnellii* ⁽¹¹⁴⁾. Otras investigaciones mencionan que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales se debe en gran medida a la presencia de terpenos y terpenoides; siguiendo en orden de actividad los que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos ^(9,101). Teniendo en cuenta los antecedentes encontrados en la literatura consultada y los resultados obtenidos, se pudiera atribuir la acción antimicrobiana del aceite esencial de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. a sus componentes terpénicos.

Del aceite esencial de *Piper carpunya Ruiz & Pav.* se identificó un total de 23 compuestos (Tabla 24). Los sesquiterpenos representaron el 43.48%, los derivados del fenilpropano el 30.43%, los monoterpenos el 17.39% mientras que un derivado imidazólico y un compuesto aminado representaron el 4.35% respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio contrastan con los reportados por De la Cruz J. quien elucidó los componentes del aceite esencial de *Piper carpunya* y determinó que los monoterpenos con un 10.86% predominaron ligeramente sobre los sesquiterpenos con un 8.41%, siendo los hidrocarburos monoterpénicos más abundantes que los monoterpenos oxigenados ⁽⁸⁵⁾. Dentro de los fenilpropanoides encontrados en el aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. destacó la presencia de safrole, isosafrole y metil isoeugenol, resultados similares a los obtenidos por Valverde P. quien reportó como principal componente identificado del aceite esencial de *Piper carpunya* el safrole con un porcentaje de 12.26% ⁽⁸⁹⁾ y a los reportados por De la Cruz quien determinó que los componentes mayoritarios encontrados en el aceite de la misma especie fueron safrole y pentadecano + E-metil isoeugenol los cuales representaron más del 70% de su composición ⁽⁸⁵⁾. Otro estudio sobre la composición de aceite esencial obtenido de las hojas de *Piper carpunya* Ruiz et Pavón recolectada en la Amazonía peruana demostró que el aceite esencial contenía safrol como principal componente con un 14.9%, también destacó la presencia de α -terpineno (12.1%), p-cimeno (10.9%), 1,8-cineol (13.0%) y spatulenol (9.8%) ⁽¹¹⁵⁾, obteniendo como componentes similares con el presente estudio el m-cimeno, spatulenol y (-)-spatulenol. Otros estudios refieren que el compuesto spatulenol destacó como componente mayoritario en el aceite esencial de otras especies de *Piper* como *Piper abbreviatum*, donde el compuesto mencionado representó un 11.2% del total de constituyentes ⁽¹⁰²⁾ mientras que en el aceite esencial de *Piper hispidum* Sw representó un 3.65% dado que este aceite se caracterizó por las cantidades bajas de sus compuestos, este destacó como uno de los principales encontrados ⁽¹¹⁶⁾. Otras investigaciones mencionan que las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales están asociadas a sus compuestos oxigenados ⁽⁸⁶⁾. Entre los compuestos a los que se

les atribuyen propiedades antibacterianas podemos citar terpenos como safrol, β -elemeno, p-cimeno, entre otros ⁽⁹⁾. Compuestos similares a estos se encontraron en el aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. a los que se les puede atribuir su acción antimicrobiana.

Del aceite esencial de ***Piper callosum* Ruiz & Pav.** se identificó 30 compuestos (Tabla 25). Los sesquiterpenos representaron el 50%, los monoterpenos el 30%, en su mayoría oxigenados, los hidrocarburos oxigenados el 6.67%, mientras que un derivado del fenilpropano, terpenoide, compuesto organoborano y un compuesto aminado el 3.33% respectivamente. Entre los monoterpenos encontrados se encontraron α -pinene, 1R- α -pinene, 2(10)-pinene, β -linalool, d-limonene, entre otros. Estos resultados podrían compararse a los obtenidos por Marcel et al. quien determinó la composición del aceite esencial de *Piper callosum* y destacó también la presencia de linalool, α -pinene, limonene, entre otros ⁽¹¹⁷⁾. Al igual que en el aceite esencial de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. estudiado, se encontró la presencia de safrole. Otros estudios también coincidieron que el aceite esencial de esta especie vegetal representa una nueva fuente de safrol ^(117,118). Múltiples investigaciones sobre la composición de aceites esenciales de otras especies de *Piper* determinaron como mayor constituyente al monoterpeno oxigenado safrol, entre ellos destacan los realizados en *Piper hispidinervum* donde el compuesto representó el 85.08% de todos los componentes de dicho aceite ⁽¹¹⁹⁾, en *Piper auritum* donde representó el 74.29% de los compuestos identificados ⁽⁹⁾ y en *Piper caninum* con un porcentaje de 17.1% ⁽¹²⁰⁾. Un estudio realizado por Dognini et al. relacionó al componente safrol como responsable de la actividad antimicrobiana del aceite esencial obtenido a partir de hojas de *Piper xylosteoides* ya que representó un 84.1% de la composición de dicho aceite ⁽¹²¹⁾, a este hecho podemos sumarle la actividad antibacteriana atribuida a este compuesto ⁽⁹⁾ para suponer que su presencia y sinergismo con otros componentes, también conocidos por sus propiedades biológicas, son los responsables de la significativa acción antimicrobiana obtenida en el presente estudio.

Del aceite esencial de *Piper amalago* L. fueron elucidados un total de 21 compuestos (Tabla 26). Los sesquiterpenos representaron el 61.9%, los monoterpenos el 28.57%, en su mayoría hidrocarburos monoterpénicos, y los compuesto aminados el 9.52%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ferraz et al. quien determinó que en el aceite esencial de *Piper amalago* predominaron los sesquiterpenos con un 46.68% y los monoterpenos con un 38.27%, asimismo de los sesquiterpenos los más abundantes fueron zingiberene, δ -elemene y β -caryophyllene mientras que limonene fue el monoterpeno más abundante seguido de α -pinene ⁽¹²²⁾. Los componentes en común con este estudio fueron τ -elemene, caryophyllene, d-limonene, 1R- α -Pinene y β -Pinene. Los resultados del presente estudio también son similares a los reportados por Mota et al. quien determinó la composición de los aceites esenciales de hojas, tallo, flores y raíces de *Piper amalago* e igualmente concluyó que los sesquiterpenos predominaron sobre los monoterpenos ⁽¹²³⁾. El predominio de sesquiterpenos y monoterpenos también se evidenció en otros estudios de aceites esenciales de otras especies del género *Piper* que corroboraron sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiespasmódicas, relajantes, entre otras ^(124,125). Este predominio de sesquiterpenos y monoterpenos se puede indicar como responsable de la buena actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Piper amalago* L. obtenida en el presente estudio.

En resumen, la elucidación estructural de los componentes de los aceites esenciales reveló que los sesquiterpenos son los componentes mayoritarios. Se encontró también la presencia de monoterpenos, derivados del fenilpropano, hidrocarburos oxigenados y no oxigenados y en su minoría derivados imidazolicos, alcaloides, compuestos aminados y organoboranos. Todos los componentes de los aceites esenciales elucidados presentaron diversos isómeros de pineno. También destacan safrole, d-limonene, copaene, spathulenol, linalool, τ -elemene, α -cubeben y (+)-longifolene por su presencia repetida en varios de los aceites esenciales estudiados. Se podría atribuir la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a su contenido de

sesquiterpenos o a su acción combinada con otros compuestos. Dentro de ellos, existe un grupo que tiene informada actividad antibacteriana como son el safrol, linalol, α -pineno, β -pineno, β -elemeno, germacreno, p-cimeno, γ -terpineno, mirceno, entre otros ⁽¹²⁶⁾. Algunos de estos se encuentran en los aceites esenciales investigados en el presente estudio.

Las diferencias cualitativas y cuantitativas entre la composición de los aceites esenciales de la presente investigación y otros estudios pueden explicarse debido a las variaciones en las condiciones ecológicas en el lugar de recolección como el clima, tipo de suelo y estación del año en que se desarrolla la planta ^(8,9,79). Esto se evidenció en la variabilidad de resultados de múltiples estudios realizados en Brasil que determinaron la composición del aceite esencial de hojas de *Piper amalago* recolectadas en diversos lugares del país. En la especie vegetal recolectada en el Distrito Federal se reveló el predominio de α -pinene, camphene, limonene, borneol, δ -cadinene y spathulenol ⁽¹²⁷⁾; por otro lado en el estado de Minas se reveló el predominio de aryophyllene oxide, E-caryophyllene, α -pinene, germacrene y bicylogermacrene ⁽¹²⁸⁾; mientras que en el Campus de la Universidad de Sao Paulo se reveló la predominancia de γ -muurolene, germacrene D, bicylogermacrene y spathulenol ⁽¹²⁹⁾. Además en la especie vegetal recolectada en el estado de Rio Grande se reveló la predominancia de limonene, δ -elemene y zingiberene ⁽¹²²⁾. También existen variaciones dadas por el método de extracción tanto de los aceites esenciales como de los extractos. Es así como Khan J. y Kumar N. realizaron una evaluación sobre las propiedades de extractos etanólicos y metanólicos de *Piper betlle*. Concluyeron que el tipo de solvente utilizado para la extracción influye en los resultados de la actividad antimicrobiana ⁽¹³⁰⁾. Estudios similares respaldan la conclusión anterior ^(93,131,132). Asimismo Navas M. y Morales G. obtuvieron variaciones en los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Piper nigrum* L. atribuidos al equipo de reflujo utilizado y al tipo de solvente extractor. Además concluyeron que aun cuando el tiempo de extracción fue igual en ambos equipos, se puede inferir que existe una especificidad de los extractos la cual está influenciada por la cantidad de muestra empleada y el volumen de solvente utilizado ⁽¹³³⁾.

VI CONCLUSIÓN

1. En relación a la prueba de difusión en agar, los aceites esenciales de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav., *Piper callosum* Ruiz & Pav. y *Piper amalago* L. presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus*. Además el extracto etanólico de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. mostró actividad frente a *Bacillus subtilis* (halo de inhibición > 18 mm).
2. En relación al método de microdilución, los aceites esenciales (CMI 0.12 ± 0.06 a 0.26 ± 0.09 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y los extractos etanólicos (CMI 5.86 ± 2.76 a 145.83 ± 95.47 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostraron actividad antimicrobiana frente a las bacterias Gram positivas en estudio, mientras que no se obtuvo actividad frente a las Gram negativas en estudio. Además todos los aceites esenciales (CMI 0.82 ± 1.12 a 3.16 ± 4.02 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y el extracto etanólico de *Piper callosum* Ruiz & Pav. (CMI 187.5 ± 88.39 $\mu\text{g}/\text{mL}$) presentaron buena actividad frente a *Candida albicans*.
3. Los componentes elucidados de los aceites esenciales de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *Piper callosum* Ruiz & Pav. y *Piper amalago* L. fueron mayoritariamente sesquiterpenos con 50%, 43.48%, 50% y 61.9%, seguidos de monoterpenos con 21.43%, 17.39%, 30% y 28.57% y finalmente fenilpropanoides con 7.14 %, 30.43%, 3.33% y 0% respectivamente.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li E. El futuro de los productos del Altiplano y los Valles Centrales de los Andes. Estado del Arte del Sector de Plantas Medicinales en Perú [Internet]. Viena: Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial; 2008 p. 70. Disponible en: www.unido.org/foresight/andean-study
2. WHO | Global infectious disease surveillance [Internet]. WHO. 2000. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs200/en/>
3. World Health Organization. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2001. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf>
4. Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SM. Plants with potencial antifungal activity employed in Brazilian folk medicine. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006;42(3):369-94.
5. Silva DR, Endo EH, Filho BPD, Nakamura CV, Svidzinski TIE, De Souza A, et al. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Piper ovatum* Vahl. *Molecules*. 16 de marzo de 2009;14(3):1171-82.
6. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):564-82.
7. Hammer KA, Carson CF. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. En: Thormar H, editor. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p. 255-306.
8. Durán DC, Monsalve LA, Martínez JR, Stashenko EE. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia Et Technica*. 2007;13(33):435-8.
9. Sánchez Y, Pino O, Correa TM, Naranjo E, Iglesia A. Estudio químico y microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de Anís). *Rev Protección Veg*. 2009;24(1):39-46.

10. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Perú). Vol. 2. Trujillo, Perú: Editora Normas Legales; 2002.
11. Wanke S, Jaramillo MA, Borsch T, Samain MS, Quandt D, Neinhuis C. Evolution of Piperales - matK gene and trnK intron sequence data reveal lineage specific resolution contrast. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007;42(2):477-97.
12. León B. Piperaceae endémicas del Perú. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. *Rev peru biol*. 2006;2(Número especial 13):492-563.
13. Dos Santos PR, De Limas D, Guimarães EF, Kaplan MA. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*. 2001;58(4):547-51.
14. Ninoska E. Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género *Piper* de la flora boliviana. [Bolivia]: Universidad de La Laguna; 2007.
15. Parra JE. Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de *Piper cf. cumanense* Kunth (Piperaceae) [masters]. Universidad Nacional de Colombia; 2011.
16. Jaramillo MA, Manos PS. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *Am J Bot*. 2001;88(4):706-16.
17. Jørgensen PM, Ulloa C, Maldonado C. Riqueza de plantas vasculares. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 2006;42(1):37-50.
18. Delgado GE, Kato MJ, Vásquez N, Minchala J, Rojas C. Cultivo de tejidos de *Piper sp.* (Piperaceae): Propagación, organogénesis y conservación de germoplasma *in vitro*. *Rev Colomb Biotecnol*. 2012;14(2):49-60.
19. Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Perú; 1999. 550 p. (Ecología y desarrollo).
20. Hassler M. World Plants: Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World in the Catalogue of Life [Internet]. The Catalogue of Life Partnership; 2016. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15468/7ppkhn>

21. Jørgensen P, Nee M, Beck S. Catálogo de las Plantas Vasculares de Bolivia [Catalogue of the Vascular Plants of Bolivia]. Missouri Botanical Garden. 2015. (Monographs in Systematic Botany; vol. 2).
22. Yuncker TG. The «Piperaceae» of Argentina, Bolivia and Chile. Universidad Nacional de Tucumán, Instituto Miguel Lillo; 1953. 396 p.
23. Duke JA, Vasquez R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. CRC Press; 1994. 224 p.
24. Reyes MA. Uso forestal de suelos erosionados con un manejo sostenible en la provincia de Huaura. [Perú]: Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión; 2012.
25. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. Missouri Botanical Garden; 1993. 1336 p.
26. Santa Cruz L. Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz-Cajamarca [Magíster en Botánica Tropical]. [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
27. Sauñe A, Reynel C. Árboles y arbustos de Piper («Matico») del Valle de Chanchamayo, Dp. de Junín (Perú). Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional Agraria La Molina; 2013.
28. Quintana K. Evaluación de la actividad gastroprotectora de los extractos de *Achillea* (*Achillea millefolium*) y *Guaviduca* (*Piper carpunya* Ruiz & Pav.) en ratas (*Rattus norvegicus*) con lesiones gástricas inducidas. [Ecuador]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2012.
29. Quezada JA. Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. [Ecuador]: Universidad Técnica Particular de Loja; 2012.
30. Tebbs, M.C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. The taxonomy of *Piper* section Churumayu. 1990;20(2):193-236.
31. Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, Souccar C, de Mendonça S, Oliveira LFS, et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of

- several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. Journal of Ethnopharmacology. 2010;128(3):583-9.
32. Arcos AL, Díaz A, Arguello ÁM, Ostolaza J. Primeras experiencias en el apoyo a cadenas de valor de productos de Biocomercio. Octava Conferencia de las Partes del Convenio de Diversidad Biológica. Documento informativo.; 2006.
 33. Brack A. Plantas medicinales de la Amazonía peruana. Estudio de su uso y cultivo. Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; 1997.
 34. Alverson WS, Moskovits DK, Shopland JM. Bolivia: Pando, Río Tahuamanu. Chicago, Illinois: Field Museum, Environmental and Conservation Programs; 2000. 92 p. (Rapid biological inventories).
 35. Chaves FCM, Batista AC, Mendonça MB, de F. Hidalgo A, Lin Chau Ming, Bizzo HR, et al. Biomass production and chemical composition of essential oil of *Piper callosum* as affected by spacing in Manaus, Amazonas State, Brazil. Acta Horticulturae. 2011;(925):233-6.
 36. Renner SS, Balslev H, Holm LB. Flowering Plants of Amazonian Ecuador: A Checklist. 1990. 241 p. (AAU Reports).
 37. Brinckmann J, Hughes K. Ethical trading and fair trade certification: The growing market for botanicals with ecological and social certification. 2010;(88):46-57.
 38. Bornstein AJ, Coe FG. The Genus *Piper* (Piperaceae) in Honduras. Novon. 2007;17(1):11-9.
 39. D'Arcy WG. Flora of Panamá: checklist and index. Missouri Botanical Garden; 1987. 690 p.
 40. Marticorena A. Catálogo de las plantas vasculares del cono sur (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay y Uruguay). Revista Chilena de Historia Natural. 2009;82(4):589-90.
 41. Zuloaga FO, Morrone O. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. 1.^a ed. Missouri Botanical Garden; 1996. 352 p.

42. Balick MJ, Arvigo R. Messages from the Gods: A guide to the useful plants of Belize. Oxford University Press. New York: Oxford University Press; 2015. 554 p.
43. Iremonger S. A Guide to Plants in the Blue Mountains of Jamaica. Jamaica: University of the West Indies Press; 2002. 300 p.
44. Standley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Natural History Museum. Chicago; 1946. 516 p. (Fieldiana. Botany).
45. Berendsohn WG, Gruber AK, Salomón JM. Angiospermae - Familias M a P y Pteridophyta. En: Nova Silva Cuscatlanica Árboles nativos e introducidos de El Salvador. Berlin: Freie Universität Bln Botanischer Garten; 2012.
46. Burger WC. Flora Costaricensis Family #41, Piperaceae. Chicago, Illinois: Field Museum of Natural History; 1971. (Fieldiana. Botany).
47. Funk VA. Checklist of the plants of the Guiana Shield: (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro, Guyana, Surinam, French Guiana). Contributions from the United States National Herbarium. 2007;55:587.
48. Da Silva V, Cunha E, Torres E, Gonçalves A, Monteiro JL, Demarchi I, et al. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2013;23(3):447-54.
49. Dos Santos V, Franco C, Amano E, Messias I, Budel J. Anatomical investigations of *Piper amalago* (jaborandi-manso) for the quality control. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2015;25(2):85-91.
50. Novaes A, Da Silva J, Barison A, Veber CL, Negrão FJ, Kassuya CA, et al. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). Phytomedicine. 2014;21(4):523-8.
51. Mullally M, Cayer C, Muhammad A, Walshe B, Ahmed F, Sanchez P, et al. Anxiolytic activity and active principles of *Piper amalago* (Piperaceae), a medicinal plant used by the Q'eqchi' Maya to treat susto, a culture-bound illness. J Ethnopharmacol. 2016;185:147-54.

52. Carhuapoma M, Angulo P. Plantas medicinales en Atención Primaria de Salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: Perspectivas de desarrollo en la región Los Libertadores Wari. Perú: IICA; 1999. 284 p.
53. Hill AF. Botánica económica: plantas útiles y productos vegetales. 1.^a ed. Barcelona, España: Omega; 1965. 615 p.
54. Miranda M, Velázquez D, Bermúdez A. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*. 2005;30(8):453-9.
55. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. Organización Mundial de la Salud; 2013 [citado 30 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/iris/handle/10665/95008>
56. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys Mollis* (muña). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2008;25(3):298-301.
57. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(suppl 1):13-8.
58. Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol*. 1994;76(6):626-31.
59. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement. En: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2015.
60. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA, Eliopoulos GM. M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition. En: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2015.
61. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 2003;10(10):813-29.
62. Pellecuer S, Allegrini J, Simeon de Bouchberg M. Huiles essentielles bactericides et fongicides. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon*. 1976;9:135-9.

63. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. En: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2015.
64. Rex JH, Alexander BD, Andes D. M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Third Edition. En: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2015.
65. Valdés R, Balvín M. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. Universidad Agraria de La Habana. En Cuba; 2000. p. 89.
66. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 2005;26(5):343-56.
67. Wallace RJ. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proceedings of the Nutrition Society. 2004;63(4):621–629.
68. Daciana C, Bara I. Plant Products as antimicrobial agents. Analele Stiintifice ale Universitatii «Alexandru Ioan Cuza» din Iasi Sec II a Genetica si Biologie Moleculara. 2007;8(1).
69. Cerrate E. Manera de preparar plantas para un herbario. Museo de Historia Natural. 1969;10.
70. Vásquez O, Alva A, Marreros J. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). Revista Amazónica de Investigación. 2001;1(1):38-42.
71. Rodríguez J. Estructura química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Eryngium foetidum* L. «siuca culantro». [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
72. Dixit S. Specifications in the flavor & fragrance industry. S. H. Kelkar & Company P. Ltd.; 2006 p. 5. (The Fragrance & Flavour Association of India Journal).
73. The United States Pharmacopeial Convention. <841> Specific Gravity en The United States Pharmacopeia 38/NF 33. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2015.

74. Juárez J, Castro A, Jaúregui J, Lizano J, Carhuapoma M, Choquesillo F. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. *Ciencia e Investigación*. 2010;13(1):9-13.
75. Ruiz J, Huamaní ME. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú [Internet]. [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2005. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1278>
76. Lock O. Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. 2.^a ed. Lima: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994. 328 p.
77. Ruiz J. Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Perú]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
78. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003;88(2-3):199-204.
79. Lee J, Lee B, Kim J, Lee S, Hong S. Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(4):391-6.
80. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007;42(4):325-9.
81. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75.
82. Tsouh PV, Kissi A, Yeboah D, Appiah R, Addo P, Tchokouaha L, et al. *In vitro* activity of selected West African medicinal plants against *Mycobacterium ulcerans* disease. *Molecules*. 2016;21(4).

83. Paredes PF, Vasconcelos F, Paim R, Marques M, De Moraes SM, Lira S, et al. Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016;2016:9.
84. De Lima EM, Cazelli DS, Pinto FE, Mazuco RA, Kalil IC, Lenz D, et al. Essential Oil from the Resin of *Protium heptaphyllum*: Chemical Composition, Cytotoxicity, Antimicrobial Activity, and Antimutagenicity. Pharmacogn Mag. 2016;12(Suppl 1):42-6.
85. De la Cruz JP. Actividad antimicrobiana, antioxidante y determinación de la composición química mediante Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM) de los aceites esenciales de 3 especies de *Piper* nativas del Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
86. Salleh WMN, Ahmad F, Khong HY. Essential oil compositions and antimicrobial activity of *Piper arborescens* Roxb. Marmara Pharmaceutical Journal. 2016;20(2):111-5.
87. Ruiz J, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriental peruano. Ciencia e investigación. 2009;12(1):41-7.
88. Kondo S, Sattaponpan C, Phongpaichit S, Srijan A, Itharat A. Antibacterial activity of Thai medicinal plants Pikutbenjakul. J Med Assoc Thai. 2010;93(7):131-5.
89. Valverde P. Composición química, potencial antimicrobiano y letal de los aceites esenciales de las hojas de Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Mastrante (*Ageratum conyzoides*), Guabiduca (*Piper carpunya*), Ajenjo (*Artemisia absinthium*) y Cedrón (*Lippia citriodora*), cultivados en la República del Ecuador. [Ecuador]: Universidad Técnica de Machala; 2015.
90. Rath C, Mohapatra S. Susceptibility characterisation of *Candida spp.* to four essential oils. Indian J Med Microbiol. 2015;33 Suppl(5):93-6.
91. Ahmad N, Abbasi BH, Fazal H. Effect of different *in vitro* culture extracts of black pepper (*Piper nigrum* L.) on toxic metabolites-producing strains. Toxicol Ind Health. 2016;32(3):500-6.

92. Morales A, Rojas J, Moujir LM, Araujo L, Rondón M. Chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of *Piper hispidum* Sw. essential oil collected in Venezuela. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013;3(6):16-20.
93. Regasini LO, Cotinguiba F, Morandim AA, Kato MJ, Scorzoni L, Mendes MJ, et al. Antimicrobial activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae) against opportunistic yeasts. *African Journal of Biotechnology*. 2009;8(12):2866-70.
94. Fernandez L, Daruliza K, Sudhakaran S, Jegathambigai R. Antimicrobial activity of the crude extract of *Piper sarmentosum* against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, *Vibrio cholera* and *Streptococcus pneumoniae*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16 Suppl 3:105-11.
95. Valle DL, Cabrera EC, Puzon JJ, Rivera WL. Antimicrobial Activities of Methanol, Ethanol and Supercritical CO₂ Extracts of Philippine *Piper betle* L. on Clinical Isolates of Gram Positive and Gram Negative Bacteria with Transferable Multiple Drug Resistance. *PLoS One*. 2016;11(1).
96. Salleh WMN, Ahmad F, Sirat HM, Yen KH. Chemical composition and antibacterial activity of the leaf and steam oils of *Piper porphyrophyllum* (Lindl.) N.E. BR. *EXCLI Journal*. 2012;11:399-406.
97. Steenkamp V, Fernandes AC, Van Rensburg CE. Antibacterial activity of Venda medicinal plants. *Fitoterapia*. 2007;78(7–8):561-4.
98. Ratnam K, Bhakshu M, Raju R. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Piper hymenophyllum* Miq.: A rare wild betel. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2015;7(1):68-71.
99. Salleh WMN, Ahmad F, Yen KH, Sirat HM. Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper officinarum* (Piperaceae). *Nat Prod Commun*. 2012;7(12):1659-62.

100. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(2):309-12.
101. Apetrei C, Spac A, Brebu M, Tuchilus C, Miron A. Composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils of a full grown tree of *Pinus cembra* L. from the Calimani mountains (Romania). *Journal of the Serbian Chemical Society.* 2013;78(1):27-37.
102. Salleh WMN, Ahmad F, Yen KH. Chemical compositions and antimicrobial activity of the essential oils of *Piper abbreviatum*, *P. erecticaule* and *P. lanatum* (Piperaceae). *Nat Prod Commun.* 2014;9(12):1795-8.
103. Zaidan M, Noor A, Badrul AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop Biomed.* 2005;22(2):165-70.
104. Reyes F, Palou E, López A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 2014;8(1):68-78.
105. Ekpo I, Osuagwu A, Agbor R, Okpako E, Ekanem B. Phytochemical composition of *Aframomum melegueta* and *Piper guineense* seeds. *Journal of Current Research in Science.* 2013;1(1):24-7.
106. Radhika K, Kumaravel B, Thamizhiniyan V, Subramanian S. Biochemical evaluation of antidiabetic activity of *Piper betel* leaves extract in alloxan-induced diabetic rats. *Asian Journal of Research in Chemistry.* 2013;6(1):76-82.
107. Arroyo J, Chávez R, Anampa A, Donaires R, Ráez J. Protective effect of *Piper aduncum* capsule on DMBA-induced breast cancer in rats. *Breast Cancer : Basic and Clinical Research.* 2015;9:41-8.
108. Jara AI. Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). [Colombia]: Universidad de Ciencias Aplicadas y ambientales; 2013.

109. Cárdenas CD. Fitoquímica de extractos de *Ocotea quixos* (canela amazónica) y *Piper carpunya* (guaviduca, pinku), potenciales fungocontroladores. *Qualitas*. 2016;11:56-83.
110. Vásquez M. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. In *Crescendo*. 2015;6(1):33-43.
111. Lognay G, Bouxin P, Marlier M, Haubruge E, Gaspar C, Rodriguez A. Composition of the essential oil of *Piper acutifolium* Ruiz. and Pav. from Peru. *Journal of Essential Oil Research*. 1996;8(6).
112. Hieu LD, Thang TD, Hoi TM, Ogunwande IA. Chemical composition of essential oils from four Vietnamese species of *Piper* (piperaceae). *J Oleo Sci*. 2014;63(3):211-7.
113. Pino N, Meléndez EM, Stashenko EE. Essential oil composition from two species of Piperaceae family grown in Colombia. *J Chromatogr Sci*. 2009;47(9):804-7.
114. Costantin MB, Sartorelli P, Limberger R, Henriques AT, Steppe M, Ferreira MJ, et al. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta Med*. 2001;67(8):771-3.
115. Vargas L, Velasco A, Pérez MJ, Palá J, Vallejo MC. Essential Oil Composition of the Leaves and Spikes of *Piper carpunya* Ruiz et Pavón (Piperaceae) from Peru. *Journal of Essential Oil Research*. 2004;16(2):122-3.
116. Sánchez Y, Correa T, Abreu Y, Cotilla L, Berroa G, Pino O. Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum* Sw. y actividad antimicrobiana sobre *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson. *Revista de Protección Vegetal*. 2014;29(3):185-91.
117. Marcel HP, Leclercq PA, Delgado HS, Kanjilal PB, Singh RS. Compositional analysis of the leaf oils of *Piper callosum* Ruiz & Pav. from Peru and *Michelia montana* Blume from India. *Journal of Spectroscopy*. 1999;14(2):51-9.

118. Barbosa Q, Câmara CA, Ramos CS, Nascimento DC, Lima JV, Guimarães EF. Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole. *Química Nova*. 2012;35(9):1806-8.
119. Sauter IP, Rossa GE, Lucas AM, Cibulski SP, Roehe PM, Da Silva LA, et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*. 2012;40:292-5.
120. Salleh W, Ahmad F, Sirat HM. Chemical Compositions, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils of *Piper caninum* Blume. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(11):7720-31.
121. Dognini J, Meneghetti EK, Teske MN, Begnini IM, Rebelo RA, Dalmarco EM, et al. Antibacterial activity of high safrole contain essential oils from *Piper xylosteoides* (Kunth) Steudel. *Journal of Essential Oil Research*. 2012;24(3):241-4.
122. Ferraz A, Balbino J, Zini CA, Ribeiro V, Bordignon S, Von Poser G. Acaricidal activity and chemical composition of the essential oil from three *Piper* species. *Parasitol Res*. 2010;107(1):243-8.
123. Mota J, Souza D, Boone C, Cardoso C, Caramão E. Identification of the Volatile Compounds of Leaf, Flower, Root and Stem Oils of *Piper amalago* (Piperaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2013;16(1):11-6.
124. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*. 2000;88(2):308-16.
125. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M, et al. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci*. 2006;78(13):1419-32.
126. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;94(3):223-53.
127. Potzernheim M, Bizzo H, Agostini T, Vieira R, Carvalho M, Gracindo L. Chemical characterization of seven *Piper* species (Piperaceae) from Federal District, Brazil, based on volatile oil constituents. *Revista Brasileira de Planta Medicinai*s. 2006;8:10-2.

128. Mesquita JMO, Cavaleiro C, Cunha AP, Lombardi JA, Oliveira AB. Comparative study of the essential oils of some species of Piperaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2005;15(1):6-12.
129. Morandim A, Pin A, Santo N, de Oliveira HC, Mendes MJ, Alecio AC, et al. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;1810-4.
130. Khan JA, Kumar N. Evaluation of Antibacterial Properties of Extracts of *Piper betle* Leaf. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2011;11(11):1-3.
131. Ali MA, Alam NM, Yeasmin S, Khan AM, Sayeed MA. Antimicrobial screening of different extracts of *Piper longum* Linn. *Res J Agric & Biol Sci*. 2007;3(6):852-7.
132. Rahman M, Uddin S, Rahman M. Efficacy of various organic extracts of *Piper betle* L. leaves against *Bacillus spp.* from soil. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology*. 2013;7(2):191-8.
133. Navas MC, Morales GB. Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. *Revista Científica UDO Agrícola*. 2009;9(3):705-10.

VIII ANEXOS

ANEXO N° 1



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311 -2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS

Lima, 25-SET. 2013

VISTA:

La solicitud, con fecha de registro 10 de septiembre de 2013, presentada por el señor José Ricardo Campos De La Cruz ante la Unidad de Gestión Documentaria de la Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre del Ministerio de Agricultura y Riego, sobre la inscripción en el Registro de profesionales y personas jurídicas que prestan servicios en materia forestal y de fauna silvestre; y,

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Decreto Supremo 030-2008-AG el ex Instituto Nacional de Recursos Naturales - INRENA fue fusionado en el Ministerio de Agricultura y según el Decreto Supremo N° 031-2008-AG se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones del mencionado Ministerio;

Que, el artículo 4° de la Ley N° 29376, precisa que las funciones del ex Instituto Nacional de Recursos Naturales - INRENA serán ejercidas por el Ministerio de Agricultura y los Gobiernos Regionales dentro del marco de sus competencias;

Que, el Procedimiento N° 19 del Texto Único de Procedimientos Administrativos del Ministerio de Agricultura, cuya modificación fue aprobada mediante Resolución Ministerial N° 212-2011-AG, publicada el 03 de junio de 2011, en el Diario Oficial "El Peruano", estipula los requisitos necesarios para la inscripción en el Registro de profesionales y personas jurídicas que prestan servicios en materia forestal y de fauna silvestre. Asimismo, señala que la Autoridad competente para resolver el presente procedimiento administrativo es la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre;

Que, el Informe Técnico N° 3235-2013-AG-DGFFS-DGEFFS, de fecha 20 de septiembre de 2013, emitido por la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre, concluye que: i) la solicitud presentada por el señor José Ricardo Campos De La Cruz cumple con la totalidad de requisitos establecidos para el trámite conforme al Procedimiento N° 19 del Texto Único de Procedimientos Administrativos-TUPA del Ministerio de Agricultura y Riego; ii) el solicitante acreditó su experiencia laboral en Identificación taxonómica de especímenes y productos de flora silvestre. Asimismo, entre algunas de sus publicaciones en el registro especializado que desea acceder se tiene: Interpretación fitosociológica de la vegetación de las lomas del desierto peruano (2011); *Bomarea spissiflora* y *Bomarea longipes* (Alstroemeriaceae) dos nuevos registros para la flora peruana (2011); Patrones de distribución de las comunidades de cactáceas en las vertientes occidentales de los Andes Peruanos (2012); *Maxillaria jostii* Dodson (ORCHIDACEAE) Un nuevo registro para la flora peruana (2012); conforme se aprecia en el currículum vitae presentado para la inscripción en el registro solicitado;

Que, en tal sentido, el referido informe recomienda aprobar la inscripción del señor José Ricardo Campos De La Cruz, en el Registro de profesionales que realizan certificación de identificación taxonómica (taxónomos-sistemáticos) de especímenes y productos de flora silvestre; teniendo en cuenta lo solicitado, para lo cual deberá emitirse el acto administrativo correspondiente;

Que, finalmente el Informe señala que debe precisarse que en el caso de configurarse supuestos de inhabilitación para contratar con el Estado, la inscripción en el registro será suspendida; y,

De conformidad con el artículo 8° del Reglamento de la Ley Forestal y de Fauna Silvestre aprobado por el Decreto Supremo N° 014-2001-AG, la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Agricultura, aprobado por el Decreto Supremo N° 031-2008-AG.



SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Aprobar la inscripción del señor José Ricardo Campos De La Cruz, en el Registro de profesionales que realizan certificación de identificación taxonómica (taxónomos-sistemáticos) de especímenes y productos de flora silvestre, con el número 36.

Artículo 2°.- Precisar que la presente inscripción en el registro se suspenderá si se configuran supuestos de inhabilitación para contratar con el Estado, así como para el ejercicio de la actividad profesional ordenada por la Autoridad Forestal y de Fauna Silvestre, el Colegio Profesional correspondiente, el Poder Judicial u otra Autoridad Competente, así como de verificarse incompatibilidad para el ejercicio profesional.

Artículo 3°.- Notificar la presente resolución al señor José Ricardo Campos De La Cruz para los fines de ley.

Artículo 4°.- Transcribir la presente resolución a la Dirección de Información y Control Forestal y de Fauna Silvestre y a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Lima.

Regístrese y comuníquese,



[Handwritten signature]
Dg. Silvia Velásquez Silva
Directora de Gestión Forestal y de
Fauna Silvestre (e)

ANEXO N° 2

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079
RD N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:


Que, MAURICIO ANTONIO GALIANO LA ROSA y SILVIA SALAMANCA RODRIGUEZ, estudiantes de la E.A.P. FARMACIA Y BIOQUÍMICA de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, han solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “matico”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Magnoliidae
ORDEN : Piperales
FAMILIA : Piperaceae
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper acutifolium* Ruiz & Pav.

Nombre vulgar: “matico”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 12 de mayo del 2015


BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO N° 3

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079
RD N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

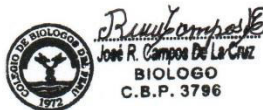
Que, MAURICIO ANTONIO GALIANO LA ROSA y SILVIA SALAMANCA RODRIGUEZ, estudiantes de la E.A.P. Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, han solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “**carpundia**”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Piper carpunya Ruiz & Pav.* Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Magnoliidae
ORDEN : Piperales
FAMILIA : Piperaceae
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

Nombre vulgar: “carpundia”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 12 de mayo del 2015



Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO N° 4

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079
RD N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

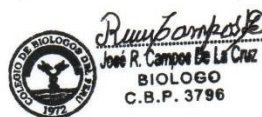
Que, MAURICIO ANTONIO GALIANO LA ROSA y SILVIA SALAMANCA RODRIGUEZ, estudiantes de la E.A.P. Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, han solicitado la certificación botánica de la planta conocida con los nombres vulgares de “huayusa macho”, “guayusa”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Piper callosum* Ruiz & Pav. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Magnoliidae
ORDEN : Piperales
FAMILIA : Piperaceae
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper callosum* Ruiz & Pav.

Nombres vulgares: “huayusa macho”, “guayusa”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 12 de mayo del 2015



Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO N° 5

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079
RD N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

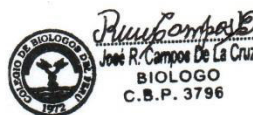
Que, MAURICIO ANTONIO GALIANO LA ROSA y SILVIA SALAMANCA RODRIGUEZ, estudiantes de la E.A.P. Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, han solicitado la certificación botánica de la planta conocida con los nombres vulgares de “matico”, “palo soldado”, la muestra ha sido determinada como *Piper amalago* L. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae
DIVISIÓN : Magnoliophyta
CLASE : Magnoliopsida
SUBCLASE : Magnoliidae
ORDEN : Piperales
FAMILIA : Piperaceae
GENERO : *Piper*
ESPECIE : *Piper amalago* L.

Nombres vulgares: “matico”, “palo soldado”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 12 de mayo del 2015



Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO N° 6

N° de Dictamen Pericial 2016002000455 Fecha de impresión 04/01/2016 08:18 N° Pag. 1 de 1



MINISTERIO PUBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
Sub Gerencia de Laboratorio de
Toxicología y Química Legal

SERVICIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE

VIVO

DICTAMEN PERICIAL N° 2016002000455

NOMBRE: SALAMANCA RODRIGUEZ SILVIA
SEXO: FEMENINO **EDAD:** **DNI:** 72666151 **CUI:** 99999992SLARDS2601017426
OCUPACIÓN: **ESTADO CIVIL:** **NIV. DE INSTRUCCIÓN:**
RML/OFICIO SIN DATOS
SOLICITADO POR: PARTICULAR - SRA.- SILVIA SALAMANCA RODRIGUEZ
FECHA DE INCIDENTE: 10/12/2015
FECHA DE RECEPCIÓN: 10/12/2015 **F.CIERRE:** 04/01/2016

ANALISIS SOLICITADO: EXAMEN QUÍMICO TOXICOLÓGICO
MUESTRA : ACEITE ESENCIAL EXTRAIDO DE PLANTA DEL GENERO PIPER

Sustancia	Resultado	Método	Cantidad	Unidad
PLAGUICIDAS ORGANO-CLORADOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
PLAGUICIDAS ORGANO-FOSFORADOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
PLAGUICIDAS CARBAMICOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
SALICILATOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
SULFAMIDADOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
ALCALOIDES	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
PSICOFARMACOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
BARBITURICOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
FENOTIACINICOS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
CANNABINOIDES	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
ANFETAMINAS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		
BENZODIAZEPINAS	NEGATIVO	Cromatografía En Capa Fina		

Observaciones : MUESTRA AGOTADA DURANTE EL ANALISIS
ANÁLISIS REALIZADO MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE GASES -
ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Conclusiones : LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS SE REPORTAN EN HOJAS APARTE

Lima, 04 de Enero de 2016

LUIS ALBERTO LÓPEZ AVILA
QUÍMICO FARMACÉUTICO
ESPECIALISTA EN TOXICOLOGÍA Y
QUÍMICA LEGAL
D.N.I. 13 87184
C.Q.F.P. 0343 NRE. 143



MINISTERIO PÚBLICO
INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
GERENCIA DE QUÍMICA LEGAL
Laboratorio de Toxicología y Química Legal

Mg. JAVIER CHORRILANCO VALDEZ
C.Q.F.P. 00750
SUBGERENTE

GONZÁLEZ ELERA SIXTO

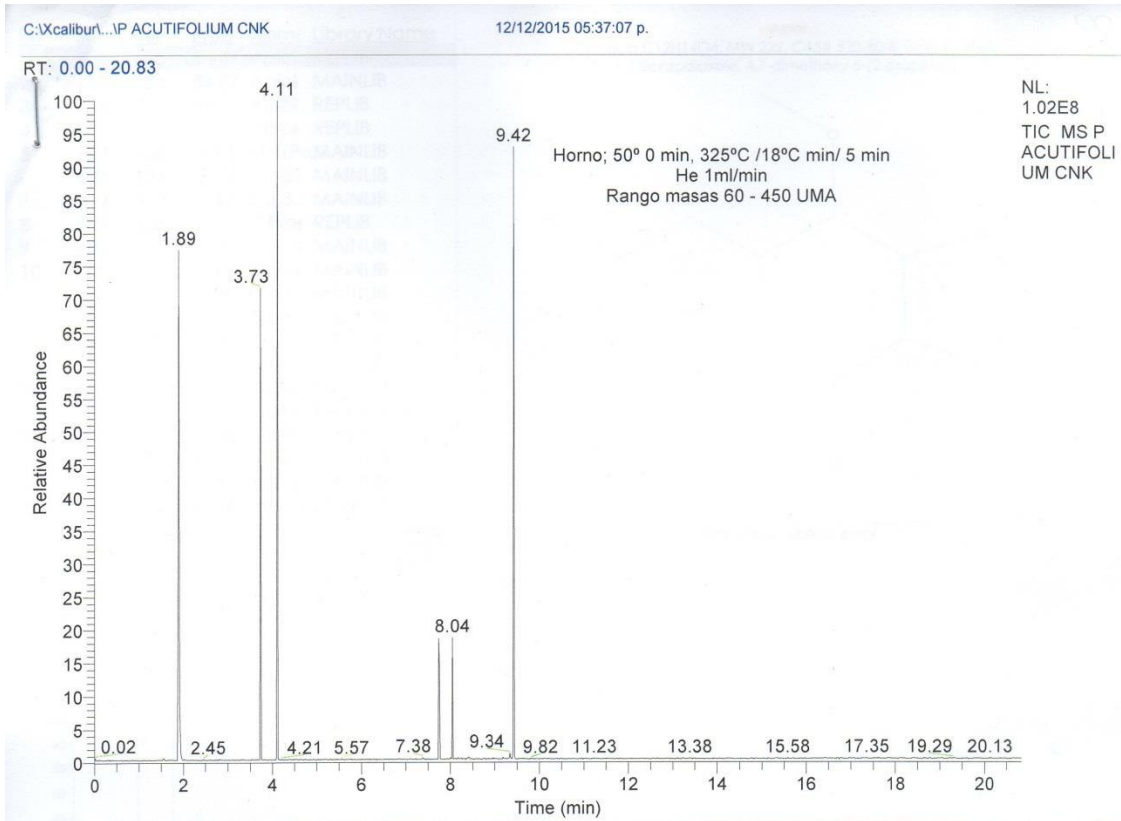
C.Q.F.P. N° 1960

DNI: 08063663

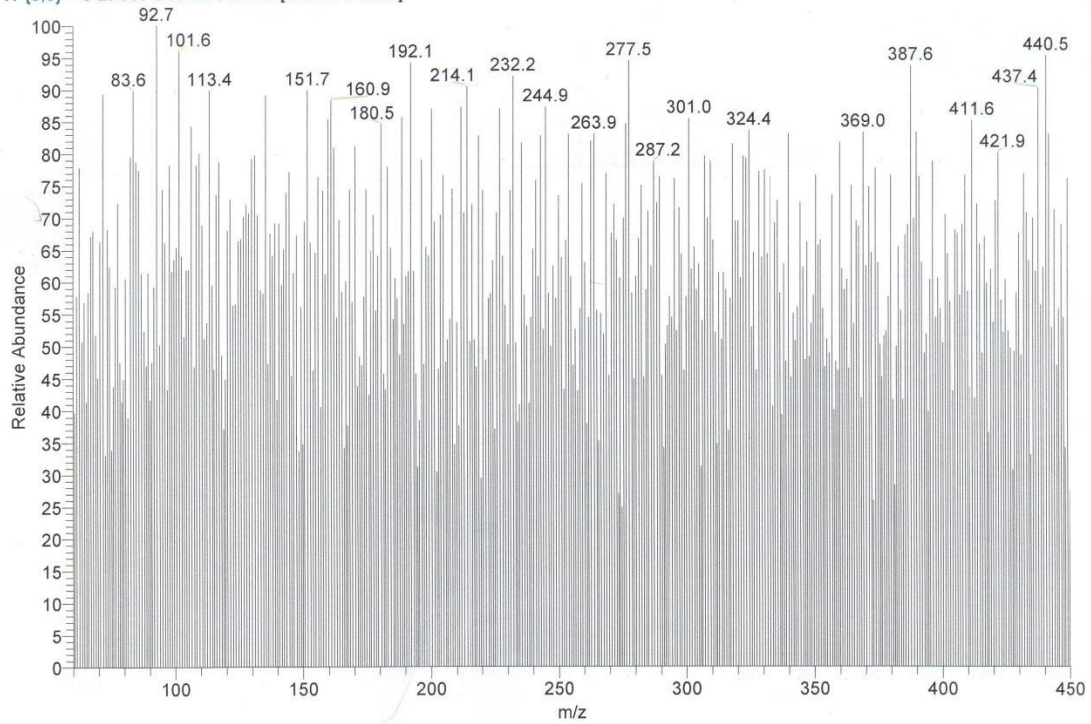
Domicilio Legal: Jr. Cangallo N° 818-Cercado de Lima

Sixto González Elera
QUÍMICO FARMACÉUTICO
C.Q.F.P. 01960
D.N.I. 08063663

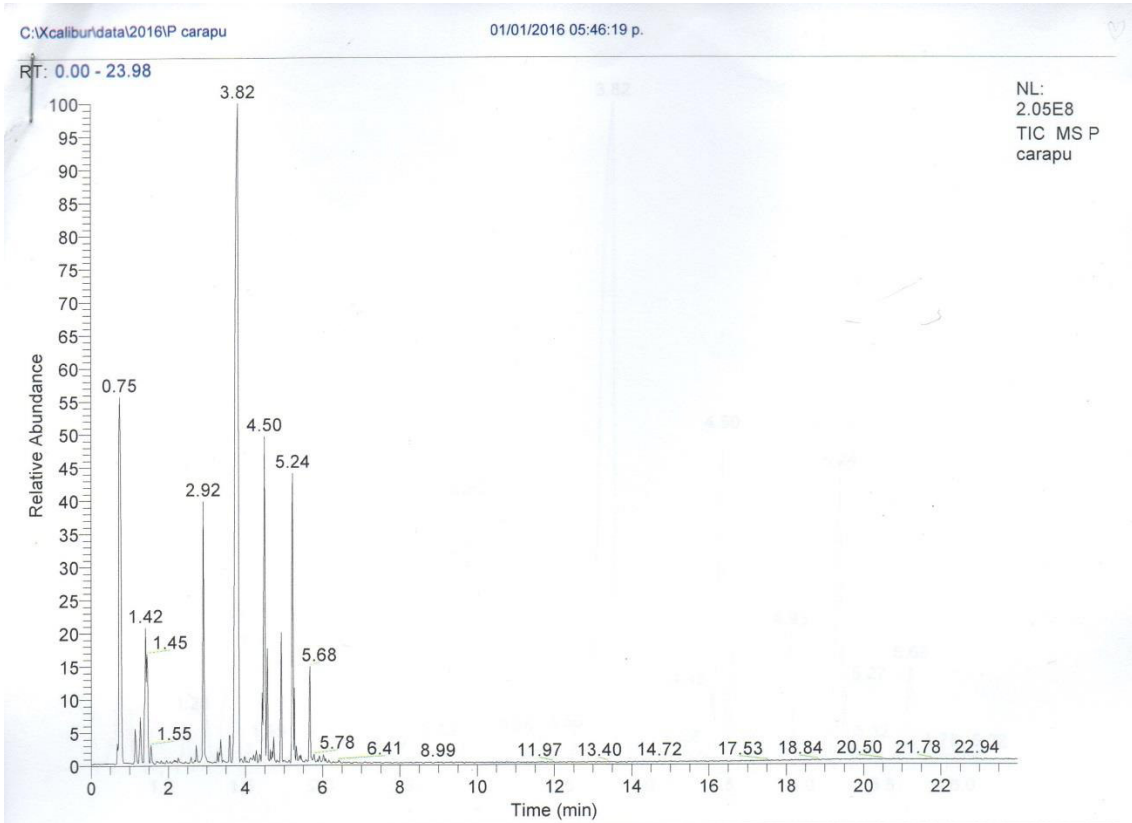
ANEXO N° 7



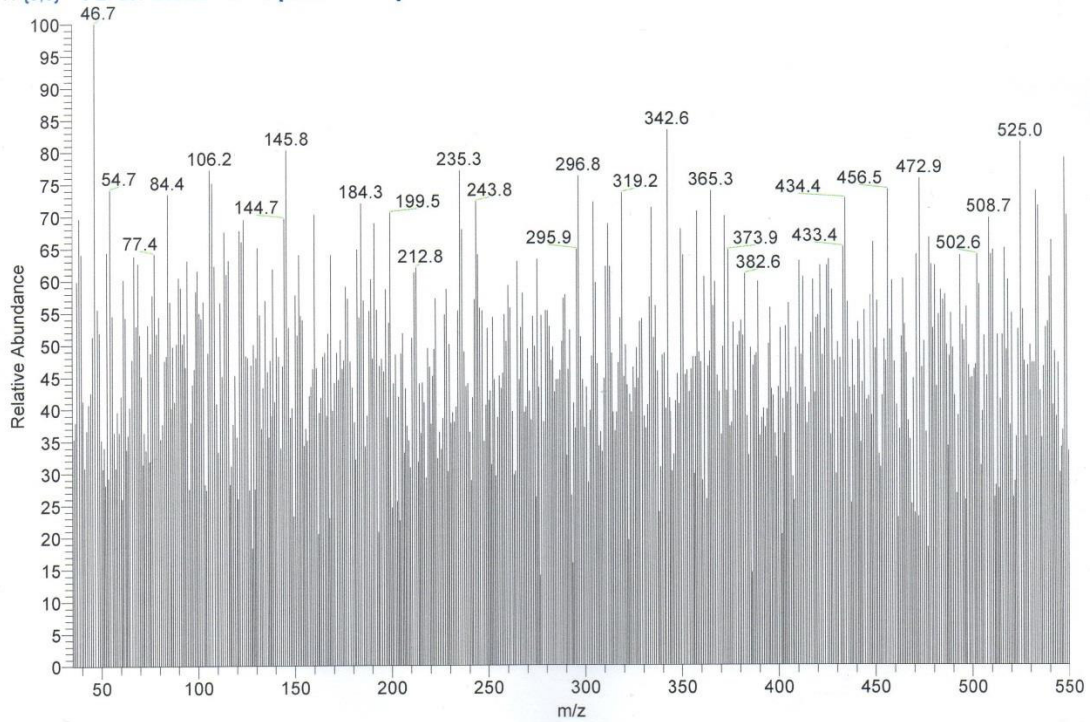
P ACUTIFOLIUM CNK #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.50E3
T: (0.0) + c EI det=200.00 Full ms [60.00-450.00]



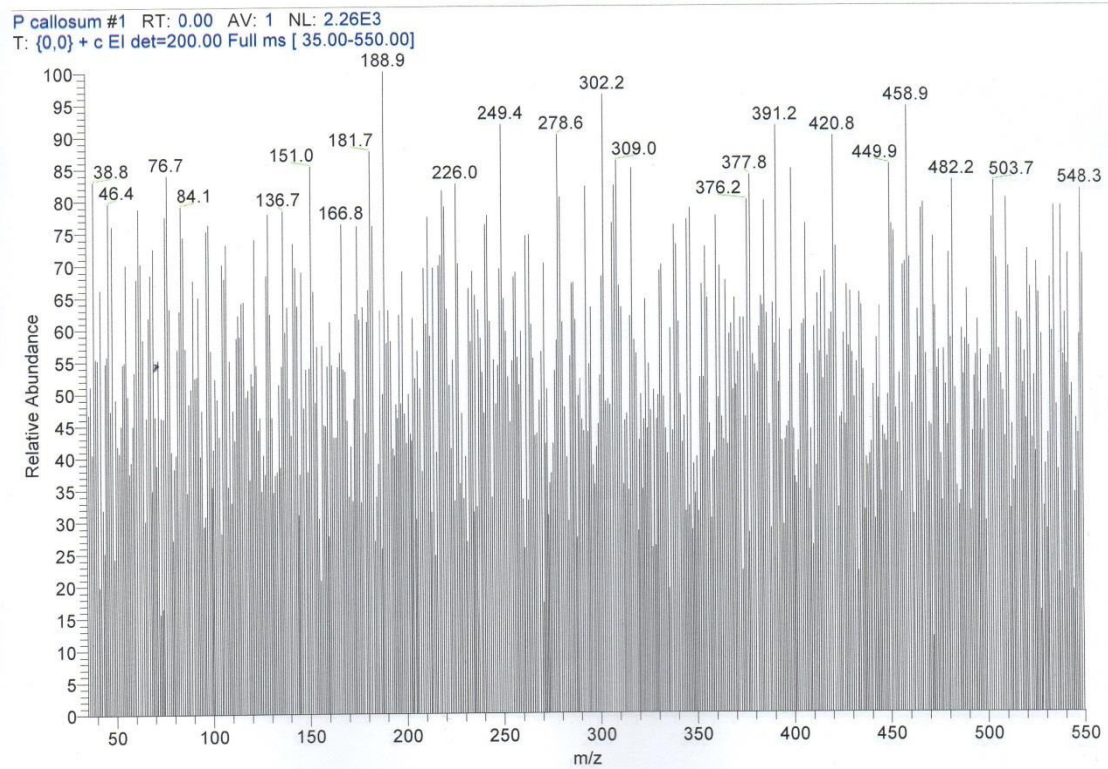
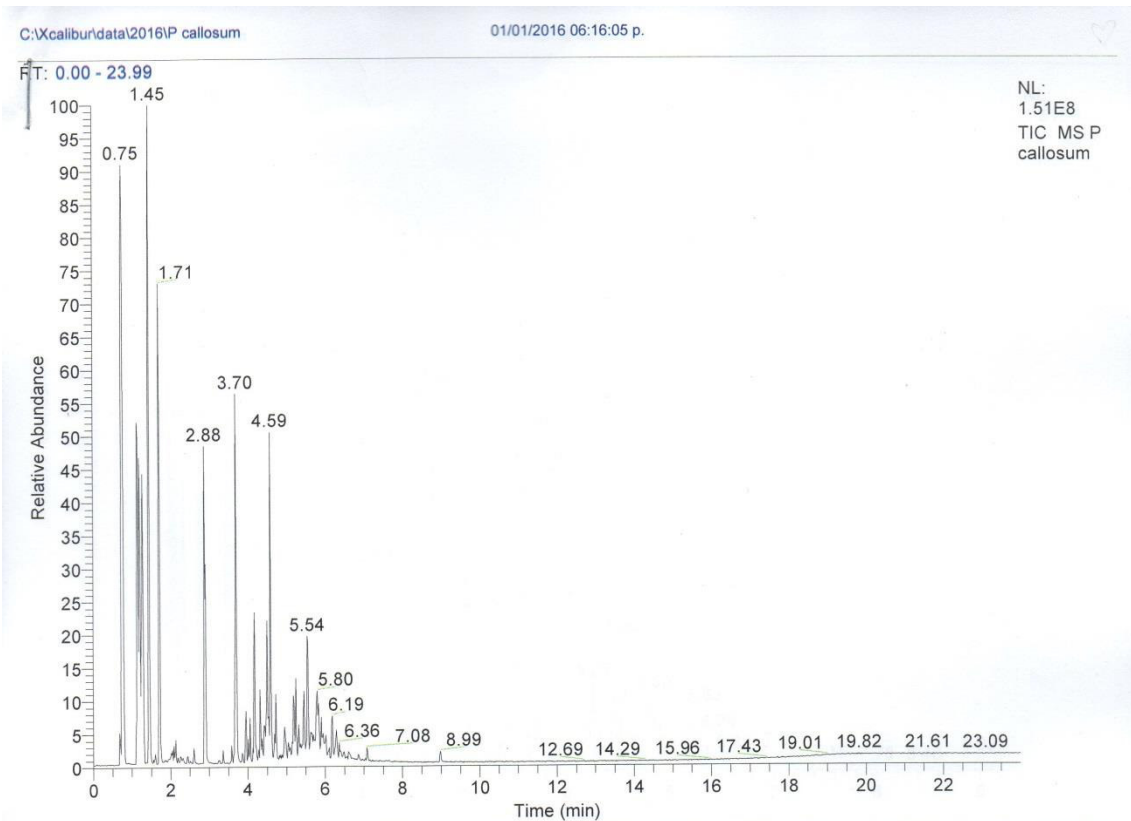
ANEXO N° 8



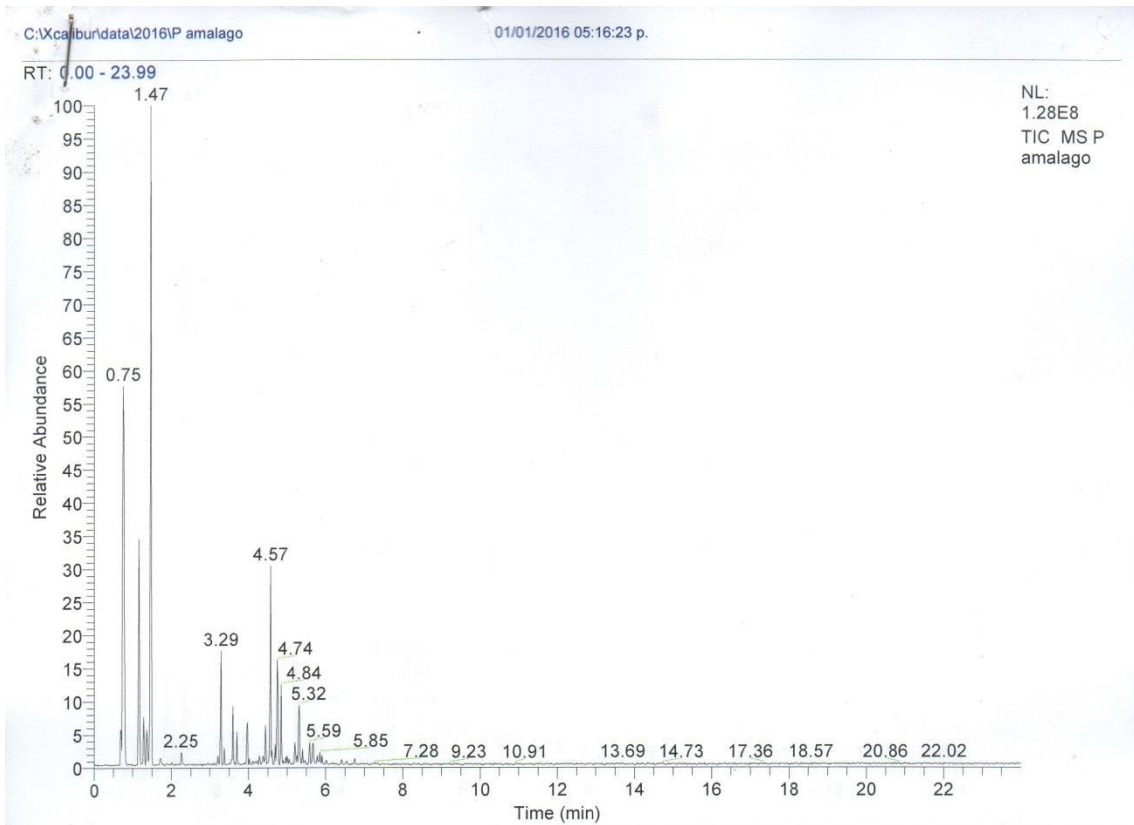
P carapu #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.75E3
T: {0.0} + c EI det=200.00 Full ms [35.00-550.00]



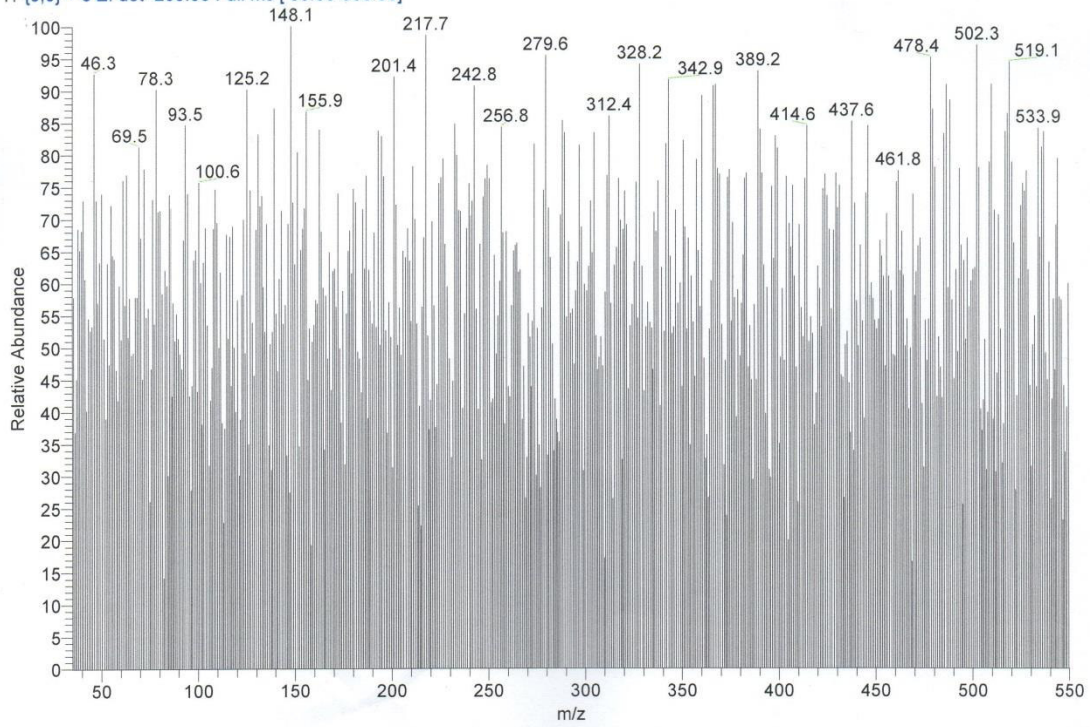
ANEXO N° 9



ANEXO N° 10



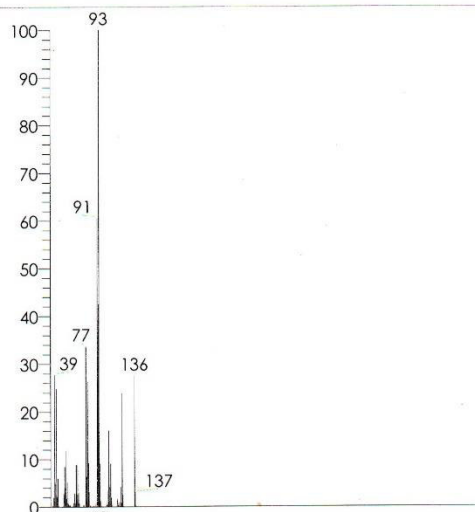
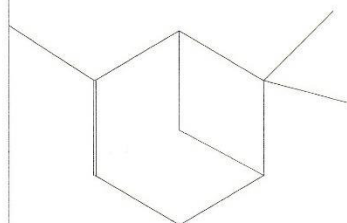
P amalago #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.29E3
T: {0,0} + c EI det=200.00 Full ms [35.00-550.00]



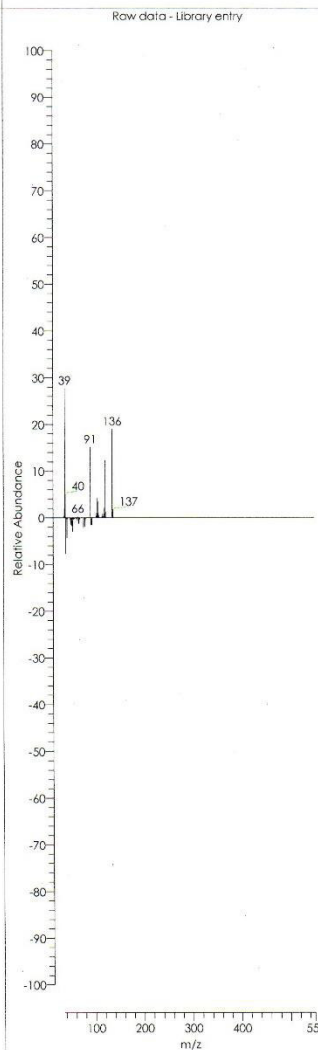
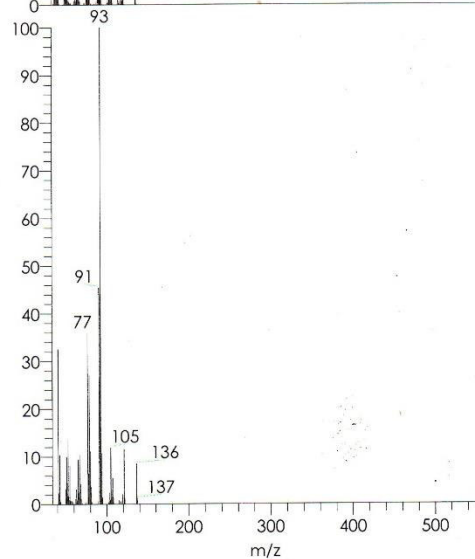
ANEXO N° 11

Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	945	949	17.04	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-	MAINLIB
2	943	944	15.72	1R- α -Pinene	MAINLIB
3	926	930	8.58	Tricyclo[2.2.1.02.6]heptane, 1,3	REPLIB
4	923	923	7.58	α -Pinene	MAINLIB
5	920	926	6.69	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-	MAINLIB
6	918	918	6.17	3-Carene	REPLIB
7	905	907	7.58	α -Pinene	REPLIB
8	903	903	3.74	1S- α -Pinene	MAINLIB
9	901	904	3.45	Tricyclo[2.2.1.02.6]heptane, 1,7	MAINLIB
10	898	904	6.17	3-Carene	MAINLIB
11	895	896	6.69	1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-	REPLIB
12	895	896	7.58	α -Pinene	REPLIB
13	894	897	2.64	Bicyclo[4.1.0]hept-2-ene, 3,7,7-	REPLIB
14	894	910	2.64	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-	REPLIB
15	893	894	3.45	Tricyclo[2.2.1.02.6]heptane, 1,7	REPLIB
16	893	893	8.58	Tricyclo[2.2.1.02.6]heptane, 1,3	MAINLIB
17	890	904	6.17	3-Carene	REPLIB
18	888	904	2.07	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-met	REPLIB
19	888	888	6.17	3-Carene	REPLIB
20	885	892	2.64	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-	MAINLIB

1R- α -Pinene
Formula C₁₀H₁₆, MW 136, CAS# 7785-70-8, Entry# 40147
1R- α -Pinene



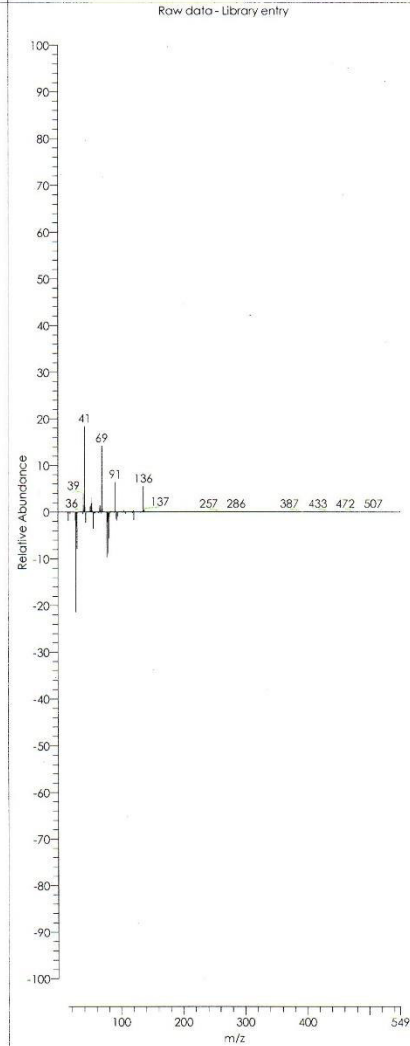
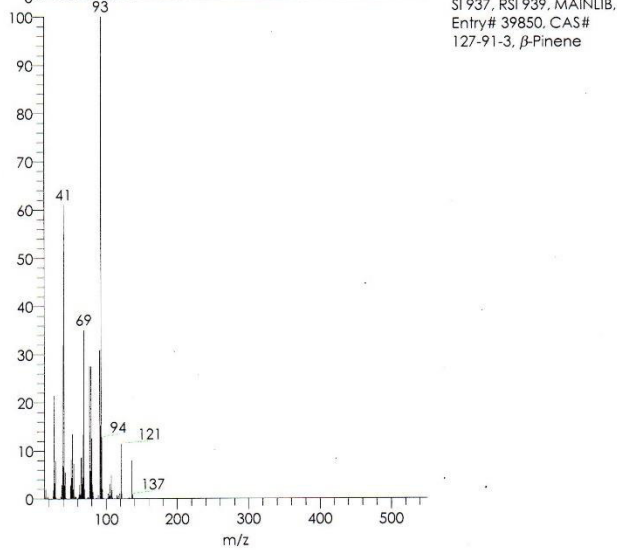
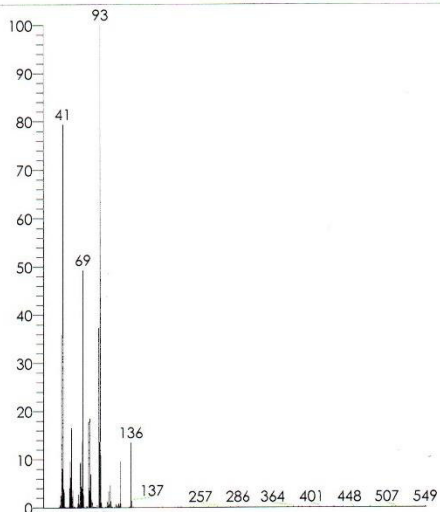
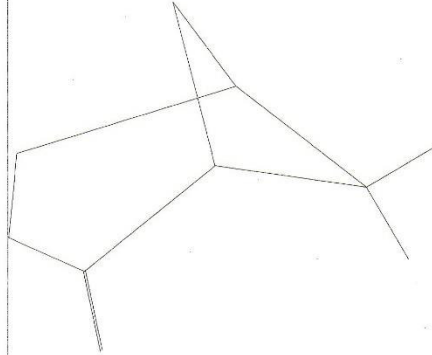
SI 943, RSI 944, MAINLIB,
Entry# 40147, CAS#
7785-70-8, 1R- α -Pinene



ANEXO N° 12

Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	938	941	37.48	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6	REPLIB
2	937	939	36.02	β -Pinene	MAINLIB
3	916	922	37.48	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6	MAINLIB
4	911	915	36.02	β -Pinene	REPLIB
5	904	904	36.02	β -Pinene	REPLIB
6	903	905	36.02	β -Pinene	REPLIB
7	903	920	9.23	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-m	REPLIB
8	901	907	37.48	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6	REPLIB
9	893	894	36.02	β -Pinene	REPLIB
10	888	888	5.59	β -Myrcene	MAINLIB
11	885	886	9.23	Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-m	MAINLIB
12	879	879	5.59	β -Myrcene	REPLIB
13	875	875	5.59	β -Myrcene	REPLIB
14	859	860	1.58	β -Phellandrene	REPLIB
15	852	865	1.21	3-Carene	REPLIB
16	851	900	1.16	Cyclohexene, 4-methyler	MAINLIB
17	841	849	0.82	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dim	REPLIB
18	835	835	1.21	3-Carene	REPLIB
19	834	835	37.48	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6	REPLIB
20	834	846	0.63	Cyclohexane, 1-methyler	MAINLIB

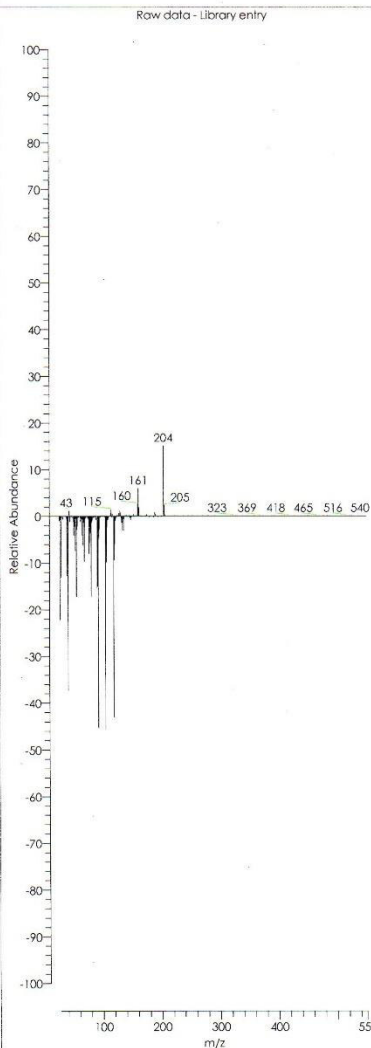
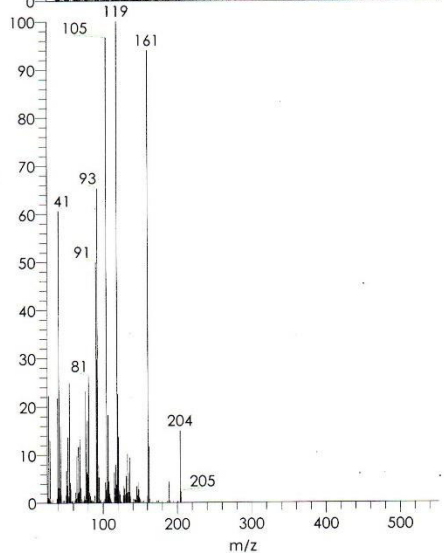
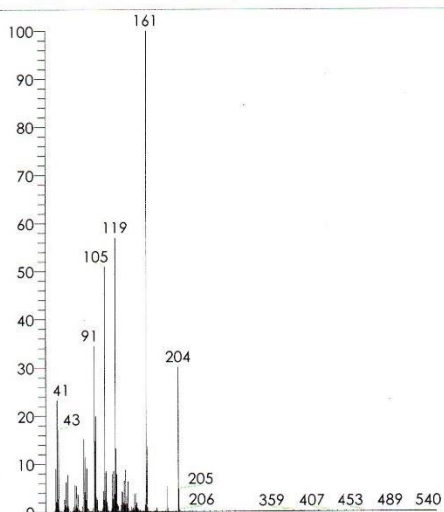
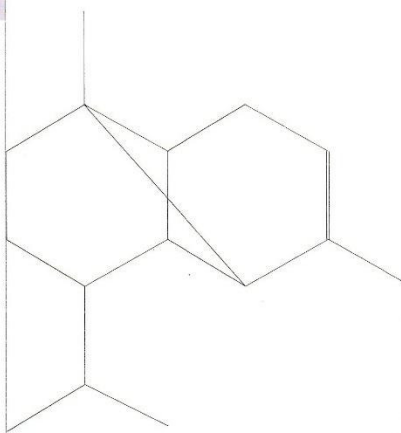
β -Pinene
Formula C₁₀H₁₆, MW 136, CAS# 127-91-3, Entry# 39850
Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methylene



ANEXO N° 13

Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	906	909	18.31	Copaene	MAINLIB
2	896	902	18.31	Copaene	REPLIB
3	892	896	11.46	α -Cubebene	REPLIB
4	889	895	10.13	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-t	MAINLIB
5	884	887	10.13	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-t	REPLIB
6	883	890	10.13	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-t	REPLIB
7	883	889	18.31	Copaene	REPLIB
8	880	910	11.46	α -Cubebene	MAINLIB
9	879	885	7.15	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-t	REPLIB
10	877	880	6.59	Ylangene	MAINLIB
11	867	870	4.65	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hex	REPLIB
12	866	878	7.15	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-t	REPLIB
13	865	874	4.65	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hex	REPLIB
14	863	879	3.93	1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa	MAINLIB
15	862	864	3.78	Isodene	MAINLIB
16	860	863	3.48	(+)-Cyclosativene	MAINLIB
17	854	877	11.46	α -Cubebene	REPLIB
18	849	854	2.39	1H-Cyclopropa[a]naphthalene	REPLIB
19	847	901	2.20	Germacrene D	MAINLIB
20	846	848	2.12	Naphthalene, 1,2,4a,5,8,8a-hex	MAINLIB

Copaene
Formula C₁₅H₂₄, MW 204, CAS# 3856-25-5, Entry# 12897



ANEXO N° 14

Hit	SI	RSI	Prob	Name	Library Name
1	917	923	83.48	Safrole p	PMWtox3N
2	844	854	83.48	1,3-Benz	REPLIB
3	821	914	83.48	1,3-Benz	REPLIB
4	820	872	6.54	1,3-Benz	MAINLIB
5	818	859	83.48	1,3-Benz	NISTDEMO
6	818	859	83.48	1,3-Benz	MAINLIB
7	816	857	5.52	Benzene	MAINLIB
8	815	850	6.54	1,3-Benz	REPLIB
9	808	809	6.54	1,3-Benz	REPLIB
10	801	849	3.35	1,3-Benz	MAINLIB
11	799	838	6.54	MDA pre	PMWtox3N
12	787	824	83.48	1,3-Benz	REPLIB
13	727	764	0.44	4-Metho	MAINLIB
14	697	806	0.12	2-Propen	REPLIB
15	694	707	0.10	MDA AC	PMWtox3N
16	683	795	0.12	2-Propen	REPLIB
17	680	800	0.12	2-Propen	REPLIB
18	675	804	0.05	1,3-Propc	PMWtox3N
19	670	718	0.04	3-Metho	MAINLIB
20	669	695	0.04	Naphtha	MAINLIB
21	666	776	0.12	2-Propen	REPLIB
22	664	694	0.03	Sulfoxide	MAINLIB
23	663	765	0.12	2-Propen	REPLIB
24	662	674	0.03	Naphtha	MAINLIB
25	661	703	0.12	2-Propen	REPLIB
26	658	685	0.02	2,3-MDA	PMWtox3N
27	658	711	0.12	2-Propen	MAINLIB
28	654	758	0.02	2-Propen	MAINLIB
29	653	786	0.12	2-Propen	REPLIB
30	650	727	0.04	Naphtha	REPLIB
31	650	708	0.01	3(2H)-Bei	MAINLIB
32	646	696	0.01	3(2H)-Bei	MAINLIB

Safrole page 653 in PMW part 2
 Formula C10H10O2, MW 162, CAS# 94-59-7, Entry# 3048
 Safrole

