

## NOMBRE DEL TRABAJO

“BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE LAS ESPECIES Piper carpunya R&P. (CARPUNYA), Piper peltatum L. (SANTA MARÍA) y Piper amalago L. (MATICO NEGRO) FRENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV, MEDIANTE EL ENSAYO EN MICROPLACAS CON RESAZURINA”

---

## RECUENTO DE PALABRAS

**19798 Words**

## RECUENTO DE CARACTERES

**114169 Characters**

## RECUENTO DE PÁGINAS

**90 Pages**

## TAMAÑO DEL ARCHIVO

**2.5MB**

## FECHA DE ENTREGA

**Jul 19, 2023 4:18 PM GMT-5**

## FECHA DEL INFORME

**Jul 19, 2023 4:20 PM GMT-5****● 13% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 13% Base de datos de Internet
- 0% Base de datos de publicaciones

**● Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)

ASESOR:

Q.F. Huanca Gabriel Isaías Loyolo

AUTOR:

Bach. Gonzalo Aire, Alexis



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y  
BIOQUÍMICA**

**TESIS:**

**BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE LAS  
ESPECIES *Piper carpunya* R&P. (CARPUNYA), *Piper peltatum* L.  
(SANTA MARÍA) y *Piper amalago* L. (MATICO NEGRO) FRENTE A  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV, MEDIANTE EL  
ENSAYO EN MICROPLACAS CON RESAZURINA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**AUTORES:**

Bach. Gonzalo Aire, Alexis

**ASESOR:**

Mg. Huanca Gabriel, Isaías Loyolo

**LINEA DE INVESTIGACION:**

Recursos Naturales

**LIMA-PERÚ**

**2023**

## **DEDICATORIA**

Yo, Alexis Gonzalo Aire dedico la tesis:

A Dios, por su guía espiritual constante para seguir esforzándome día a día

A mis padres, Javier Gonzalo Camargo y Nelly Odilia Aire Bejarano, por su amor incondicional, su dedicación para darme las herramientas para afrontar la vida y por dejarme el legado de la educación.

A mis hermanos, Gabriel Gonzalo Aire y Javier Gonzalo Aire, porque ellos son mis cómplices de vida y en quienes más confío.

A mis abuelos paternos, Nicanor (QEPD) y Nona (QEPD); a mis abuelos maternos, Gregorio y Ana, a mis tíos, primos y a toda la familia Gonzalo Aire.

## **AGRADECIMIENTOS**

A el Mg. Q.F. Isaías Loyolo Huanca Gabriel, por el apoyo constante durante la elaboración de la tesis y por sus consejos de vida.

A el Mg. Q.F. César Máximo Fuertes Ruiton y QF. Gustavo Adolfo Ruiz Pacco, por sus valiosos consejos y por su gran dedicación hacia mi persona, además del apoyo con la logística del laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la UNMSM.

Al Laboratorio Referencial de Tuberculosis DIRESA-CALLAO, en especial, a la Blga. Ada Jenny Reque Barrios y al Blgo. Cesar Gomez, quienes me apoyaron con la logística del laboratorio para poder utilizar la metodología del ensayo y manipular la micobacteria de la tuberculosis, además del seguimiento constante hacia mi persona para cumplir las normas de bioseguridad que corresponde.

## **JURADO DE SUSTENTACION**

### **PRESIDENTE**

Mg. Churango Valdez, Javier Florentino

### **SECRETARIO**

Mg. Solgorre Contreras, Enrique Juan

### **VOCAL**

QF. Huanca Gabriel, Isaías Loyolo

### Declaratoria de autenticidad

Yo, Alexis Gonzalo Aire, Con DNI N° 77418866, domiciliado en Jr Canteras Mz D15 Lote 25 Urb Mariscal Cáceres San Juan de Lurigancho-Lima.

Declaro bajo juramento:

Soy autor del trabajo de investigación **BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE LAS ESPECIES Piper carpunya R&P. (CARPUNYA), Piper peltatum L. (SANTA MARÍA) y Piper amalago L. (MATICO NEGRO) FRENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV, MEDIANTE EL ENSAYO EN MICROPLACAS CON RESAZURINA.** El texto de mi investigación no ha sido plagiado ni total ni parcialmente, se ha respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

La tesis no ha sido plagiada, por lo tanto, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener el título profesional.

Los datos presentados en la investigación son totalmente reales, no han sido publicados ni publicadas, ni copiados.

De identificarse plagio, autoplagio, plagio o falsificación, asumo las consecuencias y sanciones de mi acción deriven, sometiéndome a la normativa vigente de la Universidad Privada de Huancayo.

Lima, Septiembre 2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'ALEXIS', is written over a horizontal line.

Alexis Gonzalo Aire

## ÍNDICE

<i>Dedicatoria</i> .....	2
<i>Agradecimiento</i> .....	3
<i>Jurados</i> .....	4
<i>Declaratoria de autenticidad</i> .....	5
<i>Indice general</i> .....	6-8
<i>Indice de tablas</i> .....	9
<i>Indice de figuras</i> .....	10
<i>Resumen</i> .....	11
<i>Abstract</i> .....	12
<i>Introducción</i> .....	13-14

### **CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

1.1 Descripción de la situación problemática.....	15-16
1.2 Formulación del problema.....	16-17
1.2.1 Problema general.....	16
1.2.2 Problemas específicos .....	16-17
1.3 Objetivos de la investigación.....	17
1.3.1 Objetivo general.....	17
1.3.2 Objetivos específicos.....	17
1.4 Justificación, importancia y viabilidad de la investigación.....	18-19
1.4.1 Justificación de la investigación.....	18
1.4.2 Importancia de la investigación.....	18-19
1.4.3 Viabilidad de la investigación .....	19
1.5 Limitaciones del estudio.....	19

## **CAPÍTULO II: MARCO TEORICO**

2.1 Antecedentes .....	20-26
2.1.1 A nivel nacional .....	20-23
2.1.2 A nivel internacional .....	23-26
2.2 Bases teóricas.....	26-47
2.2.1 Tuberculosis.....	26-29
2.2.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	30-35
2.2.3 Plantas medicinales con bioactividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	36-38
2.2.4 Flavonoides y alcaloides con bioactividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	38-40
2.2.5 Bioensayos para la determinación de la bioactividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	40-43
2.2.6 <i>Piper carpunya</i> R&P.....	43-45
2.2.7 <i>Piper peltatum</i> L.....	44-46
2.2.8 <i>Piper amalago</i> L.....	46-47
2.3 Definición de términos básicos.....	48

## **CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES**

3.1 Formulación de la hipótesis.....	49
3.1.1 Hipótesis general.....	49
3.1.2 Hipótesis específicos.....	49
3.2 Identificación de variables.....	49-50
3.1.1 Variable independiente.....	49
3.1.2 Variable dependiente.....	49
3.3 Operacionalización de variables.....	50

## **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

4.1. Tipo y Nivel de investigación .....	51
--	----

4.1.1. Tipo de investigación .....	51
4.1.2. Nivel de investigación .....	51
4.2 Método y diseño de investigación .....	51
4.2.1 Método de investigación .....	51
4.2.2 Diseño de investigación .....	51
4.3 Población y muestra de la investigación .....	51
4.3.1 Población .....	51
4.3.2 Muestra .....	51
4.4 Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos ....	52-59
4.4.1 Técnicas .....	52
4.4.2 Instrumento .....	52
4.4.3 Procedimientos .....	52-59

## **CAPÍTULO V: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

5.1 Resultados de investigación.....	60-64
--------------------------------------	-------

## **CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

6.1 Discusión de investigación.....	65-70
-------------------------------------	-------

<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>71</b>
--------------------------	-----------

<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>72</b>
------------------------------	-----------

<b>FUENTES DE INFORMACIÓN .....</b>	<b>73-86</b>
-------------------------------------	--------------

<b>ANEXOS .....</b>	<b>87-91</b>
---------------------	--------------

## ÍNDICES DE TABLAS

Tabla N°1: Diluciones de la solución madre (stock) del extracto seco, a partir de 200 mg/ml (200 000 µg/ml) .....54

Tabla N°2: Diseño de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Piper carpunya* R&P. (carpunya) y *Piper peltatum* L. (santa maría), mediante el ensayo en microplacas con resazurina .....56-57

Tabla N°3: Diseño de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina .....58

Tabla N°4: Valores de la Concentración Mínima inhibitoria sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv .....60

## ÍNDICES DE FIGURAS

Figura N°1: Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las plantas en estudio sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

.....61-62

Figura N°2: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del control negativo Isoniazida por el ensayo en microplacas con resazurina

.....63

Figura N°3: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos estudiados por el ensayo en microplacas con rezasurina, toma fotográfica en el Laboratorio Referencial de Tuberculosis DIRESA-CALLAO.

.....64

## RESUMEN

### **BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE LAS ESPECIES *Piper carpunya* R&P. (CARPUNYA), *Piper peltatum* L. (SANTA MARÍA) y *Piper amalago* L. (MATICO NEGRO) FRENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV, MEDIANTE EL ENSAYO EN MICROPLACAS CON RESAZURINA**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial

**OBJETIVO:** Determinar la bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de los extractos etanólicos y cloróformicos de las hojas de las especies vegetales *Piper carpunya* R&P. (*carpunya*), *Piper peltatum* L. (*Santa María*) y *Piper amalago* L. (*matico negro*) mediante el ensayo en microplacas con resazurina.

**METODOLOGÍA:** Se recolectó hojas de las 3 especies vegetales seleccionadas según la quimiotaxonomía vigente. Se preparó en total 3 extractos etanólicos y 3 extractos clorofórmicos. Se obtuvo 6 extractos secos por evaporación rotativa. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) *in vitro* de los extractos estudiados sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en el rango de concentraciones de 2000-15.63 µg/ml, mediante el ensayo en microplacas con resazurina; siguiendo el protocolo original de Collins y Franzblau.

**RESULTADOS:** El ensayo en microplacas con resazurina determinó que el extracto clorofórmico de *Piper amalago* L. presentó un CMI igual a 62.5 µg/ml.

**CONCLUSIÓN:** El *Piper amalago* L. es una gran alternativa de extractos y metabolitos antituberculosos.

**Palabras clave:** Bioactividad significativa, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, concentración mínima inhibitoria, resazurina, *Piper carpunya* R&P. (*carpunya*), *Piper peltatum* L. (*Santa María*) y *Piper amalago* L.

## ABSTRACT

### **BIOACTIVITY OF EXTRACTS FROM THE LEAVES OF THE SPECIES *Piper carpunya* R&P. (CARPUNYA), *Piper peltatum* L. (SANTA MARÍA) and *Piper amalago* L. (MATICO NEGRO) AGAINST MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV, BY MEANS OF RESAZURIN MICROPLATE ASSAY**

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide.

**OBJECTIVE:** Determine the significant bioactivity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv of the ethanolic and cloformic extracts of the leaves of the plant species *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) and *Piper amalago* L. (matico negro) by resazurin microplate assay.

**METHODOLOGY:** Leaves of the 3 selected plant species according to the current chemotaxonomy. A total of 3 ethanolic extracts and 3 chloroform extracts were prepared. Six dry extracts were obtained by rotary evaporation. The minimum inhibitory concentration (MIC) *in vitro* of the extracts studied against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was determined in the concentration range of 2000-15.63 µg/ml, by means of the microplate assay with resazurin; following the original protocol of Collins and Franzblau.

**RESULTS:** The microplate assay with resazurin determined that the chloroform extract of *Piper amalago* L presented a MIC equal to 62.5 µg/ml.

**CONCLUSION:** *Piper amalago* L. is a great alternative for anti-tuberculous extracts and metabolites.

**Keywords:** Significant bioactivity, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, minimal inhibitory concentration, resazurin, *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) and *Piper amalago* L.

  
RUTH EVELYN SILVA CARLOS  
LICENCIADA EN EDUCACIÓN:  
INGLÉS  
DIPLOMA 108011  
06/09/2023

## INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Antes de la pandemia del coronavirus (COVID-19), la tuberculosis era la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, por delante del VIH/SIDA. Se ha publicado anualmente un informe mundial sobre la tuberculosis desde 1997 mediante la Organización Mundial de la Salud (OMS). El propósito de este informe es proporcionar una evaluación integral y actualizada del estado de la epidemia de tuberculosis y el progreso de la respuesta a nivel mundial, regional y nacional en el contexto de compromisos, estrategias y metas globales. El informe de 2020 proporciona una breve evaluación del impacto de la pandemia de COVID-19 en los servicios de TB, la carga de TB y el progreso hacia los objetivos. (1)

La pandemia de COVID-19 ha detenido el progreso anual en la prestación de servicios esenciales de TB y la reducción de la carga de la enfermedad de TB. La mayoría de los objetivos globales de TB están estancados, aunque hay algunas historias de éxito de varios países y regiones. El impacto más resaltante es una gran caída mundial en el número de individuos diagnosticados con TB y reportados. Esto bajó de 7,1 millones en 2019 a 5,8 millones en 2020. Esto representa una reducción del 18% al nivel de 2012 y se nota una cifra muy inferior a los cerca de 10 millones de personas que desarrollaron TB en 2020. El 93 % de esta caída mundial lo acapara 16 países, siendo India, Indonesia y Filipinas los más afectados. Se ha visualizado déficits continuos en los datos recogidos hasta junio de 2021. El aumento de fallecimientos por TB se debe al poco acceso al diagnóstico y tratamiento de la TB. Los individuos fallecidos VIH-negativos y VIH-positivos fueron 1,3 millones por TB (frente a 1,2 millones en 2019) y 214 000 (frente a 209 000 en 2019), respectivamente. La suma total nos da un resultado que regresa al nivel de 2017. Se visualiza que ha aumentado la incidencia de TB (la cantidad de individuos que padecen TB anualmente) de años anteriores. Se ha detenido estrepitosamente

la disminución de los casos con TB. Se proyecta que estos impactos serán mucho peores en 2021 y 2022. (1)

Surge una gran preocupación debido a la relación estrecha de esta enfermedad con otras enfermedades tales como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Se reporta que un 13% de las muertes de los individuos con este síndrome son ocasionadas por Tuberculosis. Las perspectivas para la tuberculosis son sombrías debido a la aparición de cepas multirresistentes a los fármacos terapéuticos de uso común en el tratamiento de la enfermedad, por consiguiente, es urgente el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación de sustancias antituberculosas que combatan de forma más efectiva la micobacteria y sus formas resistentes. Para esto las especies vegetales han demostrado ser una gran fuente de sustancias antimicobacterianas que pueden servir para el nuevo desarrollo de nuevos medicamentos. (2-4)

Los compuestos derivados de plantas son de interés en este contexto porque ellos son sustitutos antimicrobianos más seguros que los medicamentos producidos en la industria. (7)

Por esta razón, luego de un análisis según la quimiotaxonomía vigente fue seleccionada 3 plantas para el estudio: *Piper carpunya* R&P., *Piper peltatum* L. y *Piper amalago* L.

## CAPITULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1 Descripción de la situación problemática

La tuberculosis (TB) permanece como un importante problema de salud global. Según las recientes proyecciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) la TB en el año 2019 fue responsable del fallecimiento de 1,4 millones de individuos a nivel mundial. (1)

Se considera que la Tuberculosis es el agente causal del 13% de los fallecimientos (2). En el mundo, se reporta que la tasa de incidencia fue de 150 casos por cada 100 mil habitantes en el año 2017. En América y el Caribe, se reporta que la tasa de incidencia fue de 29 casos por 100 mil habitantes en el año 2012 (5).

Se ha verificado que, ante la ausencia de tratamiento, las tasas de mortalidad de la TB son altas; por consiguiente, el éxito del tratamiento antituberculoso es un propósito importante en el control de la TB. Desde 1995 que se realizó el reporte a nivel mundial, cerca de 66 millones de individuos con TB fueron tratados con éxito en los países que hicieron suyas las estrategias mundiales de control de la Tuberculosis de la OMS. En el año 2013, en el mundo, la tasa de éxito del tratamiento para casos nuevos fue del 86% (tasa que permanece invariable desde 2005). Hay que hacer hincapié en que las tasas de éxito de tratamiento necesitan mejorar en territorio americano y europeo (donde llegó al 75% en ambas regiones). Para los casos con tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) que iniciaron el tratamiento antituberculoso (2012), alrededor del 50% fueron tratados con éxito, pero la meta (éxito de tratamiento >75%) fue lograda por 43 países. (6)

La TB en el Perú se ubica en el décimo quinto lugar de las enfermedades mortales (9), y en el vigésimo séptimo puesto de carga de enfermedad medida por años perdidos del bienestar (10). Afecta, en su mayoría, a las comunidades más pobres

de las grandes ciudades del país. La atención privada de la TB no llega a toda la población, debido a que el estado prohíbe la venta libre de medicamentos antituberculosos (11). En el Perú la tasa de incidencia fue de 116 casos por 100 mil habitantes durante el año 2017 (5).

La Amazonía peruana es una de las zonas del mundo entero con mayor diversidad de especies vegetales (8 % del total de especies vegetales a nivel mundial), de las cuales menos del 1% han sido estudiadas. Por lo tanto, la flora peruana es, indiscutiblemente, una alternativa de fuente de extractos y metabolitos antituberculosos (8). Se necesita de métodos económicos y sensibles para la búsqueda de extractos con propiedades antituberculosas (12).

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema General**

¿Presentarán bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina?

### **1.2.2. Problemas específicos**

1. ¿Presentarán bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, los extractos etanólicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina?

2. ¿Presentarán bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, los extractos clorofórmicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina?

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Determinar la bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37RV de los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar la bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37RV de los extractos etanólicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina.
2. Determinar la bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37RV de los extractos clorofórmicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina.

## **1.4. Justificación importancia y viabilidad de la investigación**

### **1.4.1 Justificación**

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un extracto vegetal permite saber si tiene bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis*. El conocimiento de la bioactividad significativa de especies vegetales sobre *Mycobacterium tuberculosis* permitirá orientar los estudios en la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento contra la tuberculosis, utilizando la resazurina como un indicador colorimétrico de óxido-reducción que detecta la viabilidad del *Mycobacterium tuberculosis* frente a extractos vegetales y metabolitos prometedores. El ensayo en microplacas con resazurina (REMA) es un método basado en la reducción de resazurina, que vira a rosado cuando las células son viables y que permanece de color azul cuando las células no son viables. Dicho método es un método rápido, sensible y económico por lo que sería fácilmente reproducible y sin gastar más de lo necesario, motivo por el cual se usa en el presente estudio.

### **1.4.2 Importancia**

La tuberculosis pulmonar en Perú es considerada un importante problema de salud pública, y la enfermedad es altamente contagiosa y mortal, por lo que el país necesita tomar medidas económicas, técnicas y sociales para sacarla de la categoría de endémica, por lo que sería importante utilizar un método rápido, económico y sensible para determinar la bioactividad de extractos frente al *Mycobacterium tuberculosis*. De esta manera conseguir nuevas fuentes terapéuticas contra la tuberculosis a un costo mínimo.

La Amazonía peruana es una de las zonas del planeta con mayor diversidad de especies vegetales (8 % del total de especies vegetales a nivel mundial), de las

cuales menos del 1% han sido estudiadas. Por lo tanto, la flora peruana es, sin lugar a dudas, una alternativa de fuente de extractos y metabolitos antimicobacterianos.

#### **1.4.3 Viabilidad de la investigación**

Los resultados del estudio tienen validez interna dentro de investigaciones realizadas en productos naturales, en especial para la evaluación de la actividad antituberculosa, teniendo en cuenta el equipamiento del Laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y el Laboratorio de Referencia Regional de Tuberculosis DIRESA-Callao, que es un laboratorio de bioseguridad nivel 3 que tiene cabinas de bioseguridad clase II, tipo A2. A su vez, los resultados del estudio tienen validez externa porque se usarán métodos estandarizados y/o modificados a partir de publicaciones científicas que cumplen las exigencias de la investigación científica.

#### **1.5 Limitaciones de estudio**

Existen muchos factores relacionados con productos naturales como: lugar de muestreo, estación del año, tipo de extracción y solvente de extracción. Dichos factores pueden influir en la comparación de los resultados con otros estudios realizados.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

#### 2.1.1 A nivel nacional

La investigación realizada por **Alvarado J. Vásquez H., Delgado G., Trevisan D., Horna O.**, ACTIVIDAD INHIBITORIA DE PLANTAS IN VITRO DE *Drosera capillaris* SOBRE *Mycobacterium tuberculosis*, Revista peruana de biología, Perú, **2010**. Objetivo: Demostrar la actividad antimicobacteriana de especies vegetales de *Drosera capillaris* (Droseraceae). Metodología: El solvente de extracción fue el metanol y se usó el sistema de cromatografía a gas en la determinación de los metabolitos secundarios. El medio Lowenstein-Jensen, suplementado con las concentraciones 1,25; 2,5 y 5 mg/mL de la fracción clorofórmica del extracto crudo metanólico de las especies vegetales, fue usado en la evaluación del crecimiento de cinco cepas micobacterianas. Resultados: El crecimiento micobacteriano fue inhibido entre 40 – 93,1% en las concentraciones de 2,5 y 5 mg/mL. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y CMI90 fue 1,25 mg/mL y 2,5 – 5 mg/mL, respectivamente. Conclusión: el efecto antituberculoso del extracto metanólico de *Drosera capillaris* es probablemente por acción de la plumbagina y de los otros metabolitos secundarios detectados. (13)

La investigación realizada por **Ramos R., Gonzalo G.** ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE LOS EXTRACTOS, ALCALOIDES Y FLAVONOIDES DE LAS ESPECIES *Juglans neotropica* Diels., *Piper aduncum* L., *Croton lechleri* Müll. Arg., *Lantana camara* L., *Annona cherimola* Mill, *Annona muricata* L. y *Jatropha gossypifolia* L. FRENTE A *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, MEDIANTE EL ENSAYO EN MICROPLACAS CON AZUL DE ALAMAR (MABA), Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico, Perú, **2014**. Objetivo: Determinar la bioactividad antituberculosa de los extractos, alcaloides y flavonoides de las especies seleccionadas, mediante el método MABA. Metodología: Se preparó

extractos etanólicos y clorofórmicos de las especies vegetales seleccionadas. Se aisló flavonoides con cromatografía a escala preparativa descendente en papel Whatman N° 01 con el sistema de solventes n –butanol, ácido acético, agua en relación 4: 1: 5 y elución en metanol de bandas fluorescentes presentes en el papel Whatman. Se analizó la actividad antituberculosa de los extractos, alcaloides y flavonoides mediante el screening antimicobacteriano con ayuda del método MABA a tres concentraciones (10, 100 y 1000 µg/ml); siguiendo el protocolo original de Collins y Franzblau con algunas variaciones. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos con actividad antituberculosa significativa en el rango de concentraciones de 2000-15.63 µg/ml, mediante el método MABA; siguiendo el protocolo original de Collins y Franzblau. Resultados: El screening antimicobacteriano basado en el azul de alamar indicó que los 14 extractos estudiados (100%) presentaron bioactividad antituberculosa a 1000 µg/ml. El MABA determinó que el extracto etanólico de *Piper Aduncum* L. presentó un CMI igual a 31.5 µg/ml. Conclusión: El *Piper aduncum* L. es una gran alternativa de extractos y metabolitos para el tratamiento de la tuberculosis. (14)

La investigación realizada por **Salamanca S. y Galiano M.** ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE CUATRO ESPECIES DEL GÉNERO PIPER Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE SUS ACEITES ESENCIALES, Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico, Perú, **2016**.. Objetivo: Evaluar la actividad antibacteriana a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI) 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. Metodología: Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método demicrodilución colorimétrica con resazurina 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. Resultados: El extracto etanólico de *Piper*

*amalago* L. presentó buena actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (CMI=5.86 ± 2.76 µg/mL), *Bacillus subtilis* (CMI = 15.63 ± 0 µg/mL) y *Bacillus cereus* (CMI = 15.63 ± 0 µg/mL). El extracto etanólico de *Piper acutifolium* Ruiz & Pav. presentó su mejor buena actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva *Bacillus cereus* (CMI = 7.81 ± 0 µg/mL). El extracto etanólico de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. presentó su mejor buena actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (CMI = 9.77 ± 8.29 µg/mL). El extracto etanólico de *Piper callosum* Ruiz & Pav. presentó su mejor buena actividad antibacteriana frente las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (CMI = 15.63 ± 0 µg/mL), *Bacillus subtilis* (CMI = 15.63 ± 0 µg/mL) y *Bacillus cereus* (CMI = 15.63 ± 0 µg/mL).(110)

La investigación realizada por **Pajares A. y Steban J.** ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LAS NANOPARTÍCULAS DEL RIZOMA DE *Curcuma longa*, MEDIANTE EL MÉTODO MODS MODIFICADO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis* H37RV, Tesis para obtener el título profesional de Biólogo-Microbiólogo, Perú, **2017**. Objetivo: Evaluar la actividad antituberculosa de las nanopartículas de curcuminoides del rizoma de *Curcuma longa in vitro* mediante el método MODS. Metodología: Se utilizó el método de flash nanoprecipitación para obtener nanopartículas de curcuminoides del rizoma de *Curcuma longa*. Según la técnica del MODS, se utilizó concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 % v/v para la suspensión de nanopartículas con medio Middlebrook 7H9 en cada pocillo, luego se añadió la suspensión bacteriana conteniendo 105 ufc/ml, la placa se colocó a incubación a 37°C durante 15 días. Resultados: Pasado los 15 días se visualizó crecimiento en el control positivo y no se visualizó crecimiento alguno en ninguno de los pocillos conteniendo medio con nanopartículas de curcuminoides. Conclusión: Las nanopartículas de curcuminoides

obtenidos del rizoma de *Curcuma longa* tienen una interesante actividad antituberculosa. (15)

La investigación realizada por **Gonzales et al.** ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ACEITES ESENCIALES DE *Minthostachys mollis* Griseb. "MUÑA" Y *Piper carpunya* Ruíz & Pav. "PINKU", Revista Ciencia e Investigación, Perú, **2022**. Objetivo: Evaluar la actividad antibacteriana a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI), de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* Griseb. y *Piper carpunya* Ruíz & Pav. Metodología: Los aceites esenciales se obtuvieron por destilación por arrastre de vapor a partir de las hojas. Cada aceite esencial se puso *in vitro* frente a bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y las bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* mediante el ensayo en microplacas con resazurina para obtener el CMI. Resultados: Los aceites esenciales de *M. mollis* tuvieron un CMI para *S. aureus* de 8,86 µg /ml, y un CMI para *E. coli* de 70,88 µg /ml y, en *P. carpunya*, para *S. aureus* un CMI de 5,12 µg /ml y para *E. coli* un CMI de 20,46 µg/ml. (115)

### 2.1.2 A nivel internacional

La investigación realizada por **Baquero E., Benavides J., Sepúlveda. L, Quiñones W. et al.**, ACTIVIDAD ANTIMICOBACTERIANA DE ALGUNAS PLANTAS DE LA FLORA COLOMBIANA, Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal, Colombia, **2007**. Objetivo: Encontrar metabolitos activos antituberculosos a partir de plantas del país de Colombia que pueden ser utilizadas en el tratamiento de tuberculosis. Metodología: Se recolectaron hojas de 15 especies vegetales pertenecientes a cuatro familias de la flora colombiana. La maceración de las especies vegetales se realizó mediante un percolador con hexano y luego etanol. Se aislaron los compuestos dehidroxicubebina, metilpiperitol, isokusunokinina, episesamina, metilpluviatilol y titonina mediante cromatografía en

columna. Se analizó la actividad antituberculosa mediante el ensayo del Azul de Alamar (MABA) utilizando la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*, y por último se analizaron espectros  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN uni y bidimensionales de fracciones y compuestos aislados usando un espectrómetro Bruker AMX300. Para el análisis de la actividad biológica se tuvo en cuenta la presencia en extractos o fracciones de señales de RMN relacionadas a compuestos del tipo lignano, detectadas por la presencia de grupos metilendioxi, metilos y lactonas. Resultados: El análisis de la actividad antituberculosa indica que 4 de los extractos totales evaluados tuvieron un buen potencial antimicobacteriano. Conclusión: Los extractos y fracciones de *Virola calophylla*, *V. flexuosa*, *Piper* sp., *P. hispidum*, y *Dugandiodendron* sp, a  $128\ \mu\text{g/ml}$ , presentan una buena bioactividad antituberculosa. (16)

La investigación realizada por **Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, Ibrahim P.** ACTIVIDADES ANTIOXIDANTES, ANTI-TB, FENÓLICAS Y AMIDAS DE EXTRACTOS ESTANDARIZADOS DE *Piper sarmentosum* Roxb, Investigación de productos naturales, Malasia, Octubre, **2009**. Objetivos: Determinar si los extractos etanólicos y acuosos tienen una bioactividad significativa antituberculosa. Metodología: Se analizaron extractos acuosos y etanólicos de las diferentes partes de *Piper sarmentosum* mediante HPLC en busca de compuestos marcadores para estandarizar estos extractos. Se investigó la actividad antioxidante de los extractos estandarizados (modelo de linoleato de  $\beta$ -caroteno y modelo DPPH), actividad antiTB (ensayo de tetrazolio en microplaca) y estimación del contenido total de fenoles y amidas. Resultados: Se halló una correlación positiva entre la actividad antioxidante, el contenido de polifenoles, flavonoides y amidas, en el modelo de linoleato de  $\beta$ -caroteno ( $p=0.05$ ) y modelo DPPH ( $p=0.01$ ). Se encontró que el método analítico tiene linealidad  $> 0.9922$ , coeficiente de varianza  $<5\%$  y precisión  $95.5 \pm 5$  a  $96.9 \pm 5$ . El CMI anti-TBC de los extractos fue  $12.5\ \mu\text{g/ml}$ . Conclusión: Se determinó que *Piper sarmentosum* Roxb. posee propiedades antioxidantes y anti-TB prometedoras. (17)

La investigación realizada por **Jimenez M., Cornejo J., Leon R.** LAS PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO FUENTE DE COMPUESTO ANTIMICOBACTERIANOS, **México, 2010**. Objetivos: Recopilar la información de los trabajos de investigación publicados del 2000 al 2010, sobre el efecto antituberculoso de ciertas plantas medicinales mexicanas. Metodología: Se analizó la actividad antituberculosa de cerca de 75 especies de la flora medicinal mexicana. Estas especies fueron seleccionadas en base a sus usos médicos tradicionales. El principal método utilizado para la evaluación biológica de los extractos, fracciones y/o metabolitos fue el ensayo en microplacas con azul de alamar (MABA), y algunas muestras fueron evaluadas por el método radiorespirométrico Bactec 460. En este trabajo se considera que tienen actividad significativa antituberculosa a aquellos extractos o metabolitos con concentración mínima inhibitoria (CMI) menor a 50 µg/mL. Resultados: Son destacables por su actividad antituberculosa las especies *Phoradendron robinsonii*, *Larrea divericata*, *Amphiteryngium adstringens*, *Buddleja cordata*, *Piper sanctum*, *Arracacia toluensis*, *Carya illinoensis*, *Diospyros anisandra* y *Thymus vulgaris*. El 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil) tetradecano, 2-oxo-16-(3',4'-metilendioxfenil) hexadecano, cefaranona B, piperolactama A, 5,6-dehidro7,8-dihidrometisticina, suberosina, escobarina A, los ácidos oleanólico y ursólico, la mezcla de estos dos últimos y la mezcla de E y Z-fitol, con CMI < 25 µg/mL, son los metabolitos más destacados del presente trabajo. Ciertos glicolípidos macrolactónicos del género *Ipomoea* presentan actividad antituberculosa significativa (CMI < 32 µg/mL). Conclusiones: El cuarto lugar a nivel mundial por su biodiversidad vegetal (aproximadamente 25,000 especies) lo tiene bien ganado el país de México, enlazado a la enorme riqueza etnobotánica con la que cuenta, ya que alrededor del 15% de estas especies son utilizadas en la medicina tradicional para aliviar diversas enfermedades y/o patologías. Diversas especies vegetales están descritas para tratar síntomas y/o signos relacionados con la tuberculosis (como tos con esputo sanguinolento, tos con fiebre nocturna y pérdida de peso, entre otros), por lo que este criterio ha permitido la selección de algunas especies que han sido objeto de evaluación antituberculosa, empleando

como microorganismo de prueba *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Dicha evaluación de especies vegetales mexicanas permite la obtención de la información que será recopilada en este trabajo. (18)

## **2.2 BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1 Tuberculosis**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa y contagiosa de curso subagudo o crónico. En el ser humano esta infección puede ser multiorgánica, pero se localiza en los pulmones en la mayoría de casos. La TB pulmonar (TBP) es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. Otros agentes causales son *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum* (51). Se presenta los siguientes tipos: tuberculosis pulmonar y tuberculosis extrapulmonar.

La tuberculosis pulmonar es el tipo de tuberculosis que presenta más casos, visualizándose en más de un 80% de los casos totales. Es el único tipo de tuberculosis que puede ser contagiada y por consiguiente se le da prioridad en su búsqueda y tratamiento. Los microorganismos de los pacientes con tuberculosis pulmonar son visualizados en examen microscópico de muestra de esputo (casos positivos por la micobacteria). Este tipo de pacientes son altamente contagiosos, pudiendo transmitir la infección probablemente a 10 ó 15 personas al año, mientras que los pacientes que son positivos por cultivo Löwenstein-Jensen, desarrollan la enfermedad aproximadamente 7 a 10 veces con menos infección (52).

El contacto íntimo interpersonal a través de la inhalación de aire con partículas infectadas es la principal forma de contagio. Es poco común que se adquiera por ingestión o heridas cutáneas. Inicialmente la micobacteria se enfoca en los campos pulmonares medio o inferior, multiplicándose fácilmente (53).

La tuberculosis extrapulmonar puede afectar cualquier parte del organismo, los casos extrapulmonares son contagiosos en situaciones poco comunes y sus dos formas más graves son la tuberculosis miliar y la meningitis tuberculosa. (52)

Por otro lado, la respuesta inmune en la tuberculosis se produce fundamentalmente a través de la vía Th1, con poca o ninguna participación de la vía Th2. Después que las micobacterias son inhaladas, los macrófagos alveolares se activan, los agentes infecciosos son internalizados y el aparato bactericida, tales como la generación de compuestos nitrogenados intermedios, se desencadena en un intento para eliminar los bacilos en este punto. (54, 55)

Si las micobacterias sobreviven, la segunda etapa comienza, en la que se dividen dentro de los macrófagos. Por último, ya no son capaces de eliminar los agentes infecciosos por si solos, por lo que induce la producción de citocinas como la IL- 6, IL- 12, IL- 1 $\alpha$  y IL - 1 $\beta$ , dando como resultado el reclutamiento de monocitos, linfocitos, neutrófilos y células dendríticas. CD4+, CD8+ y linfocitos NK son estimulados por las interleucinas (IL- 12 y IL - 18) producidas por las células dendríticas de liberación de IFN  $\gamma$  a fin de estimular la producción de INR (Intermediarios de Nitrógeno Reactivo), IOR (Intermediarios de Oxígeno Reactivo) y TNF  $\alpha$ . La intensidad de la producción de IFN  $\gamma$  se considera hoy como un marcador importante con eficaz respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* (atenuada o natural), relevante para el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico y vacunas para tuberculosis. (54-56)

Después del fracaso inicial de los mecanismos de defensa, el cuerpo comienza un nuevo intento de controlar el crecimiento de la población de micobacterias a través de los granulomas estimuladas por TNF  $\alpha$ <sup>45</sup>. La liberación de IL - 1, IL - 6, INR y IOR por los macrófagos será activada. La presencia crónica de estas interleuquinas que estimulan macrófagos causará, en definitiva, su diferenciación en células epitelioides y gigantes que se organizarán ellos mismos, en mayor o menor medida,

en los granulomas de acuerdo con los factores individuales del hospedero. Los animales de laboratorio con deficiencia de TNF -  $\alpha$  no pueden formar granulomas eficaces, lo que confirma su importancia en la eficacia de la respuesta celular. (54, 55)

La defensa dará lugar a la estabilización, la infección latente o la cura, mientras que la no defensa causará daño a los tejidos y difusión. Con el tiempo, la persistencia del *Mycobacterium tuberculosis* dentro del granuloma, asociado a posibles fallos en el sistema inmunológico, mantendrá las posibilidades de una reactivación central y una preocupación constante. Además de lo mencionado, la vía de las células Th17 estimulada por las interleuquinas IL - 17 e IL -23, ha sido recientemente estudiado y considerado como una parte esencial en la inducción, formación y mantenimiento de granulomas en el largo plazo. (54, 55)

Según el Informe 2020 de Control de Tuberculosis de la OMS, se considera que cerca de 10 millones de personas enfermaron de tuberculosis en 2019 a nivel mundial, una cifra que se ha ido reduciendo aletargadamente en los últimos años. En 2019 se registraron 1,2 millones de muertes por tuberculosis entre individuos VIH-negativos y otras 208 000 muertes entre individuos VIH-positivos. Los hombres mayores de 15 años constituyeron el 56% de todos los casos de tuberculosis en 2019. En comparación, las mujeres representaron el 32% y los niños menores de 15 años el 12%. El 8,6% fueron personas con Virus de la Inmunodeficiencia adquirida (VIH) de los casos totales a nivel mundial. Los casos más frecuentes de tuberculosis de 2019 se registraron en los países de Asia Sudoriental (44%), África (25%) y el Pacífico Occidental (18%), con porcentajes menores en el Mediterráneo Oriental (8,2%), América (2,9%) y Europa (2,5%). Ocho países curiosamente constituyeron dos tercios del total mundial, y a los que hay que aplicar mayores estrategias contra la TB, y ellos son: India (26%), Indonesia (8,5%), China (8,4%), Filipinas (6,0%), Pakistán (5,7%), Nigeria (4,4%), Bangladesh (3,6%) y Sudáfrica (3,6%). Los otros 22 países de la lista de la OMS con alta carga de tuberculosis

acapararon el 21% de los casos mundiales. En 2019, 54 países tenían una baja incidencia de tuberculosis (menores de 10 casos por cada 100 000 habitantes por año), principalmente en América y Europa, además de algunos países de las regiones del Mediterráneo Oriental y del Pacífico Occidental. Estos países tienen una situación favorable para lograr la eliminación de la tuberculosis. (1)

En el Perú la tasa de incidencia fue de 116 casos por 100 mil habitantes durante el año 2017. (5)

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad con gran impacto en Salud Pública y presente en todo el Perú. En la década de los años 80, nuestro país fue calificado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como un país endémico de tuberculosis, por ser uno de los países con elevada prevalencia e incidencia de TB en América y tener una baja cobertura de tratamiento. Durante los años 90, el gobierno se centró mucho en el programa de control de esta enfermedad, permitiendo contar con recursos para el diagnóstico, capacitación al personal, brindar tratamiento gratuito e impulsar el tratamiento supervisado en primera y segunda fase como estándar nacional. El acceso a diagnóstico y tratamiento gratuito fueron los pilares en la Estrategia Sanitaria contra la TB ya que permitió detectar por lo menos al 70% de los casos, curar al 85% de los casos de TB sensible y reducir la mortalidad por TB significativamente, con lo que el Perú salió de la lista de los 23 países con mayor prevalencia de TB en el mundo. Curiosamente, esta década también se caracterizó por la detección de los primeros casos de TB multidrogorresistente (TB MDR) en nuestro país a mediados de la década de los 90. Desde entonces hasta el año 2003, en el país se evidenció una disminución sostenida en la incidencia de TB mayor al 8% anual; posterior a esta época la tendencia se ha mantenido, sin embargo, se ha observado con preocupación una disminución anual menor al 2% desde el 2010 al 2015. (101)

### 2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

El género *Mycobacterium* está compuesto por más de 150 especies que residen en una amplia variedad de hábitats. La mayoría de las micobacterias son organismos ambientales que no están asociados con enfermedades o son patógenos oportunistas que causan enfermedades no transmisibles en los individuos inmunocomprometidos. En contraste, un pequeño número de especies, tales como el bacilo de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, son patógenos adaptados a hospedadores en los cuales no hay reservorios ambientales conocidos. En los últimos años, los estudios de disrupción génica utilizando el patógeno adaptado a hospedadores han descubierto una serie de "factores de virulencia," pero los datos genómicos indican que muchos de estos elementos están presentes en micobacterias no patógenas. Esto sugiere que gran parte de la estructura genética que activa la virulencia en el patógeno adaptado a hospedadores ya está presente en el medio ambiente de los miembros del género. Además de estos factores generales, la hipótesis de que las moléculas elaboradas exclusivamente por patógenos especializados pueden estar implicados en la capacidad de *Mycobacterium tuberculosis* para infectar, persistir y causar patología transmisible en su especie hospedadora, el *Homo sapiens*. (19)

Las micobacterias pertenecen taxonómicamente al género *Mycobacterium*, único de la familia *Mycobacteriaceae*, perteneciente al orden *Actinomycetales*. En el esquema de clasificación de Bergey, dicha familia se incluye dentro del grupo de bacilos aerobios grampositivos, donde se encuentran, además, la familia *Corynebacteriaceae* y las *Nocardioformes* (incluye a los géneros *Nocardia* y *Rhodococcus*) (20). El género *Mycobacterium* se divide en tres grupos: complejo tuberculosis, formado por *M. tuberculosis*, *M. bovis* (incluida la cepa BCG), *M. africanum* y *M. microti* (21), recientemente fueron identificadas tres subespecies de *M. tuberculosis*: *M. caprae* (20), *M. canettii* (23) y *M. pinnipedii* (24). El otro grupo está formado por el complejo lepra, que incluye *M. leprae* y *M. leprae-murinum*,

causantes de la lepra en el hombre y en el ratón respectivamente; y un grupo de especies denominadas micobacterias "no tuberculosas", donde se incluyen el resto de las especies no comprendidas en los dos grupos anteriores, que pueden ser patógenas verdaderas, patógenas oportunistas o saprófitas (20). *Mycobacterium tuberculosis* es un microorganismo recto o ligeramente doblado en forma de varilla, no móvil esporulado, bacilo encapsulado, mide de 1 a 10 micras de largo por 0.2 a 0.6µm de ancho; su característica más importante es que es teñido de rojo por fucsina y no se decolora dentro de las acciones de alcohol y ácido (bacilos ácido resistente). Su pared celular tiene un alto contenido de lípidos que otorga resistencia contra la acción de agentes químicos, sin embargo, es susceptible a la acción de agentes físicos (calor y la radiación ultravioleta). (25)

Hay estudios que consideran que las micobacterias son distintas del resto de las bacterias, debido a la particular estructura y composición química de su pared celular. (26)

La envoltura celular de las micobacterias incluye la membrana citoplasmática que está conformada por una bicapa lipídica rodeada por un espacio periplasmático y cantidades variables de peptidoglicano, siendo este último el responsable de la forma celular. (27, 28)

La estructura original de la célula micobacteriana es su pared celular, estructura con múltiples capas, de aproximadamente 20 nm de espesor; químicamente, la pared es muy compleja y diferente a la que presentan las bacterias grampositivas y gramnegativas. Al igual que en los otros grupos bacterianos está conformada por cadenas de polisacáridos y de forma similar a las bacterias gramnegativas, presentan lípidos externos. Las micobacterias presentan lípidos complejos de los cuales algunos son exclusivos de ellos y producen marcados efectos biológicos sobre el huésped. Presenta una capa de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos. (20,28-29)

Uno de los componentes más particulares de la pared micobacteriana son los ácidos micólicos. Estos componentes son largas cadenas de ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono, perpendiculares a la superficie de la célula, presentan escasos dobles enlaces, lo que confiere hidrofobicidad a la capa y la convierte en una efectiva barrera contra la penetración de nutrientes hidrofílicos y antibióticos. (20, 27, 29)

Los glucósidos fenólicos, glicolípidos (principalmente trehalosa unida a las fracciones de ácidos micólicos) y glicopeptidolípidos componen la parte más externa de la pared micobacteriana. (30)

Los lipoarabinomananos son otros componentes lipídicos de gran importancia, se extienden desde la membrana citoplasmática hasta la superficie celular y cuya estructura parece jugar un papel importante en la patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis*. (28, 31)

*Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno estrictamente aeróbico que requiere ciertas condiciones para crecer y multiplicarse: oxígeno, nutrientes y pH adecuado en el medio. Cuenta con aproximadamente 4000 genes con la mayor parte de ellos involucrados en los mecanismos de evasión del sistema inmune. Por ejemplo, 200 de los genes están involucrados en el metabolismo de los lípidos. Se enfatiza que los lípidos son la fuente principal de energía del *Mycobacterium tuberculosis* y son directamente responsables tanto por su capacidad para multiplicarse en los tejidos hospedadores como para formar las paredes celulares. También se puede considerar parásito intracelular facultativo, porque es capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro y fuera de la célula fagocítica. (32)

Aunque algunas vías metabólicas en *Mycobacterium tuberculosis* se diferencian de otras especies bacterianas, el genoma microbiano tiene todos los elementos y las

vías necesarias para sintetizar biomoléculas esenciales (aminoácidos, vitaminas y cofactores de enzimas) necesarios para su crecimiento y replicación. (33, 34)

La evidencia en diversos estudios de genómica ha mostrado que la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de metabolizar los hidratos de carbono, hidrocarburos, alcoholes, cetonas y ácidos carboxílicos a través de la vía del glicólisis, la vía de las pentosas fosfato, el ciclo del ácido tricarboxílico, y el ciclo del glioxilato, respectivamente. (34, 35)

*Mycobacterium tuberculosis* posee un gran número de moléculas lipófilas, que van a partir de ácidos grasos comunes hasta glicolípidos (36) y las moléculas de cadena muy larga (tales como ácidos micólicos). (37)

En *Mycobacterium tuberculosis*, los lípidos se metabolizan para producir energía esencial para el crecimiento y replicación de micobacterias. Muchos, sin embargo, también se utilizan en la síntesis de diversos componentes directamente involucrados con la pared celular de micobacterias, que a su vez juegan un papel particular en la virulencia de micobacterias. La mayoría de complejos y enzimas necesarias para la degradación de los lípidos, son codificadas por una gran cantidad de estos genes , e incluyen: 36 acil-CoA sintasa, 36 acil-CoA deshidrogenasa (capaz de catalizar el paso inicial en la degradación de ácidos grasos); 21 enzimas asociadas con la superfamilia de la enoil - CoA hidratasa / isomerasa; seis 3 - hidroxiacil -CoA deshidrogenasas (38) (responsable de la conversión de ácidos grasos 3 - hidroxil a ácidos grasos 3 - ceto) (28); y seis acetil- CoA C-acetiltransferasas, que completa la  $\beta$  -oxidación, eventualmente para producir dos moléculas de acetil -CoA. (38)

Cinco copias del grupo de genes ESX (ESX- 1-ESX-5), denominados colectivamente la región del grupo de genes ESAT- 6, se han identificado en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* (39). Se cree que seis genes situados dentro de la agrupación que codifican los componentes esenciales del sistema de

secreción tipo VII (T7S) son responsables del transporte de la virulencia y proteínas asociadas al crecimiento a través de la pared celular altamente hidrofóbica del organismo. (40)

Estas cinco copias funcionan independientemente una de la otra. Considerando que el ESX - 1 y ESX - 5 se han relacionado con la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*, ESX - 3 se ha implicado en la absorción de hierro y zinc por el patógeno. (41, 42)

Retos metabólicos y ambientales amenazan la viabilidad de *Mycobacterium tuberculosis*. Este organismo en consecuencia, ha desarrollado una gama amplia de factores de regulación para adaptarse y sobrevivir (43). Tras el descubrimiento de tres nuevos genes en 2002 (44); el genoma presenta ahora 11 pares de genes relacionados con las quinasas sensores de histidina y sus reguladores asociados de respuesta (43). Las proteínas reguladoras presentes en el genoma de la cepa H37Rv ahora se saben que son superiores a 100, con 13 factores sigma que son responsables de la supervisión de la expresión génica a nivel de la iniciación de la transcripción. (43)

Se han identificado en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* muchos de los genes que codifican las proteínas fuertemente asociadas con la virulencia y patogenicidad. La identificación de estos genes estimula nuevas investigaciones en relación con sus respectivos productos y considera su influencia tanto en el metabolismo y su papel en la patogenicidad. (45)

Los medicamentos antituberculosos de primera línea como la isoniazida, etambutol, pirazinamida, estreptomina y rifampicina (46, 47) tienen distintos objetivos terapéuticos en los diferentes procesos del *Mycobacterium tuberculosis* que causa la tuberculosis. Estos procesos metabólicos donde se dirigen los fármacos antes mencionados son considerados esenciales en la micobacteria para la viabilidad, la

patogenia, la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas, la replicación del ADN, y el transporte extracelular (48).

La biosíntesis de los ácidos grasos es otra vía esencial para la supervivencia bacteriana. Se ha demostrado que la isoniazida y etambutol inhiben la síntesis de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. La isoniazida inhibe la síntesis de los ácidos micólicos y etambutol, la síntesis de arabinogalactano en la pared celular, que son componentes esenciales de la micomembrana necesarios para secretar proteínas asociadas a la virulencia a través del sistema T7S. (47)

Pirazinamida, un análogo estructural de la nicotinamida, se dirige al metabolismo de la energía, también a través de la disrupción de la membrana extracelular de *Mycobacterium tuberculosis* (49). Por último, estreptomina y rifampicina inhiben tanto la síntesis de proteínas como los ácidos nucleicos; la estreptomina interfiere más específicamente con la biosíntesis de proteínas, inhibiendo la iniciación de la traducción de ARNm (49), mientras que la rifampicina interfiere con la síntesis de ARN bacteriana, inhibiendo eficazmente la transcripción de ADN bacteriano a ARN mediante la unión a la subunidad  $\beta$  de ARN polimerasa- DNA dependiente que está codificada por el gen *rpoB* (51).

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* resistente a la rifampicina está usualmente acompañada de altos índices de mortalidad en comparación con otros medicamentos de primera línea (50), la resistencia a la rifampicina suele ir acompañada de la resistencia a uno o más de los otros antibióticos de primera línea (49). Las mutaciones en la  $\beta$  - subunidad de la ARN polimerasa codificada por el gen *rpoB*, una enzima crucial para la transcripción bacteriana de ADN a ARN, han demostrado que causa resistencia a la rifampicina (49).

### 2.2.3 Plantas medicinales con bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis*

Stephens et al (117), determinaron la bioactividad de algunos compuestos sintéticos del tipo 2,5- difenilfurano con una concentración mínima inhibitoria (CMI)  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$  frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Estos compuestos son análogos estructurales de compuestos naturales del tipo lignano. Plantas medicinales colombianas de las familias Magnoliaceae, Piperaceae, Myristicaceae y Lauraceae se destacan por la presencia de una gran diversidad de metabolitos de naturaleza lignoide. Por ello, estas especies vegetales pueden ser potenciales agentes antituberculosos. Por tal razón, en el presente estudio seleccionamos especies vegetales del género Piper.

En el Perú se reportan 500 especies del género Piper, de las cuales 21 han sido identificadas bajo la forma de plantas endémicas; de la misma manera, 11 especies del género Annona y 4 especies del género Juglans. (59)

A la fecha se han realizado estudios para determinar la bioactividad contra *Mycobacterium tuberculosis* de diversas plantas medicinales a nivel mundial:

Baquero et.al, determinaron que los extractos y fracciones de *Virola calophylla*, *V. flexuosa*, *Piper sp.*, *Piper hispidum*, y *Dugandiodendron sp*, a  $128 \mu\text{g/ml}$ , presentan una bioactividad promisoría frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. Resaltando el extracto etanólico y hexánico de las hojas de *Virola flexuosa*, el extracto etanólico de las hojas de *Piper sp* y el extracto etanólico de la madera de *Piper hispidum*, que tiene bioactividad antituberculosa promisoría (16)

Según Jiménez et al, *Phoradendron robinsonii*, *Larrea divericata*, *Amphiteryngium adstringens*, *Buddleja cordata*, *Piper sanctum*, *Arracacia toluensis*, *Carya illinoensis*, *Diospyros anisandra* y *Thymus vulgaris* poseen bioactividad antituberculosa significativa. Resaltando los extractos de una mezcla diclorometano: metanol (1:1) de tallos y de las hojas de *Piper sanctum*, que a concentración de  $100 \mu\text{g/mL}$  tiene bioactividad antituberculosa significativa (18)

Cruz-Vega et al, estudiaron la actividad antituberculosa de 28 extractos de cuatro especies diferentes de plantas que se han utilizado en la medicina tradicional mexicana para tratar la tuberculosis. Los extractos crudos de la corteza y hojas de *Juglans regia* L., *Juglans mollis* Engelm., *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch y *Bocconia frutescens* mostraron actividad antituberculosa. Los extractos hexánicos de corteza de *C. illinoensis*, *J. mollis* y *J. regia* fueron los más activos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 31, 50 y 100 µg/ml, respectivamente. Los extractos metanólicos y hexánicos de hojas de *Bocconia frutescens* tienen un CMI de 125 µg/ml. Ninguno de los extractos acuosos mostraron actividad antituberculosa. (60)

Hussain et al., fraccionaron el extracto metanólico de las hojas de *Piper sarmentosum* Roxb. y determinaron que la fracción de acetato de etilo muestra actividad antituberculosa con CMI de 3.12 µg / ml. (17)

Lall et al., determinaron que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Croton pseudopulchellus*, *Ekebergia capensis*, *Euclea natalensis* y *Polygala myrtifolia Nidorella anomala* fue 100 µg/ml frente al *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por el método radiométrico. (61)

Kirimuhuzya et al., estudiaron el extracto metanólico de *Lantana camara* recolectado en el Sur-Oeste de Uganda, país situado en el África, que mostró bioactividad frente a la cepa H37Rv del *Mycobacterium tuberculosis* con CMI de 20 µg/ml. (62)

Rojas et al., utilizaron el ensayo conocido como TEMA (tetrazolium microplate assay), para evaluar la bioactividad *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* de 102 extractos de 84 plantas peruanas, muchas de ellas usadas en la medicina popular para el tratamiento de inflamaciones severas o desórdenes infecciosos. Los extractos con mayor actividad contra la cepa sensible H37Rv y la multidroga-resistente (MDR) de *Mycobacterium tuberculosis* fueron: *Annona montana* Macfad. (Annonaceae), *Cajanus cajan* (L) Mills. (Fabaceae), *Heliotropium arborescens* L.

(Boraginaceae), *Iryanthera lancifolia* Ducke (Myristaceae) y *Swartzia polyphylla* DC (Fabaceae). (63)

S. Phongpaichit et al., determinaron la concentración mínima inhibitoria del extracto clorofórmico de frutos de *Piper chaba* frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra que resultó 16 µg/ml y concluyeron que tienen bioactividad promisorio contra la tuberculosis. También el extracto clorofórmico de las hojas de *Piper betle* tuvo CMI de 62.5 µg/ml frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y también tiene bioactividad antituberculosa significativa (113)

Laurentiz et al, determinaron la concentración mínima inhibitoria de 2 lignanos procedente del extracto etanólico de semillas de *Piper cubeba* frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium* que resultó 62,5 µg/ml respectivamente y concluyeron que tienen bioactividad promisorio contra la tuberculosis. (114)

Gonzalo G y Ramos R, determinaron la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que resultó 31,5 µg/ml y concluyeron que tienen bioactividad significativa y buena contra la tuberculosis. (14)

#### **2.2.4 Flavonoides y alcaloides con bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis***

Los productos naturales obtenidos de plantas han sido y son una fuente importante de nuevos fármacos antituberculosos (4).

La presencia de los flavonoides en la naturaleza y sus potenciales beneficios en la salud humana han concitado un creciente interés en su estudio, prueba de ello son las numerosas publicaciones que hay sobre la actividad biológica de estos componentes. (64)

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto básico de 15 carbonos, compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano. (65)

La acción antibacteriana y antifúngica de los alcaloides se podría deber a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida. (66)

No existe una definición exacta para los alcaloides, pero son compuestos orgánicos (pueden ser heterocíclico o no heterocíclicos), de estructura compleja, de origen natural, nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), su carácter es más o menos básico, biosintetizado generalmente de los aminoácidos y con propiedad farmacológicas importantes a dosis bajas. La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica, de los alcaloides y los antibióticos, hacen de estos dos grupos, los más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico. (67,68)

A la fecha se han realizado algunos estudios para determinar la bioactividad de flavonoides y alcaloides contra *Mycobacterium tuberculosis*:

En el género Piper se han encontrado moléculas activas frente a *Mycobacterium tuberculosis* como el alcaloide piperina (CMI = 50 µg/ml) (69)

Otros metabolitos secundarios con importante actividad antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* fueron seis alcaloides y dos flavonoides (flavanonas) (CMI < 25 µg/mL): fueron la dihidroqueleritina, 6-metoxi-dihidroqueleritina, 6-metoxi-dihidroquelirubina, liriodenina, peracetilestric-tosidina lactama, faeantina, 5,7-dihidroxi- 6-metil-8-prenil-flavanona y pinostrobina. (17)

Los alcaloides 6-metoxidihidroqueleritina y 6-metoxi-dihidroquelirubina, y el flavonoide (flavanona) pinostrobina poseen valor de CMI de 12,5 µg/ml frente a la cepa sensible de *Mycobacterium tuberculosis*. (70)

En los alcaloides, la presencia del grupo alcoxi en el átomo del nitrógeno terminal es un muy importante factor para la actividad antimicobacteriana. (71)

### **2.2.5 Bioensayos para la determinación de la bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis***

En los últimos tiempos, se han desarrollado métodos eficientes y rápidos para la determinación de la bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

El método radiométrico Bactec 460 se basa en la evaluación del índice de crecimiento de los cultivos en 4 ml de medio de Middlebrook 7H9 suplementado con ácido palmítico marcado con  $^{14}\text{C}$ ; cuando el ácido palmítico es metabolizado por las micobacterias, genera  $^{14}\text{C-CO}_2$ , que se detecta aún en muy pequeñas cantidades. Cuando una cepa se inocula en este medio, adicionado a un agente antituberculoso en concentración predeterminada (o crítica) y se mide el crecimiento, comparándola con el obtenido en un medio sin el medicamento, puede obtenerse una relación expresada en porcentaje de inhibición en comparación al control. Aunque este sistema reduce el tiempo de evaluación de posibles agentes antituberculosos, a 6-8 días, los costos son elevados. Mediante este bioensayo se puede obtener el porcentaje de inhibición del crecimiento micobacteriano y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un posible compuesto antituberculoso. Se requiere de la compra del equipo y contar con una licencia oficial para el manejo y uso de radioisótopos. Este método está siendo substituido por uno que utiliza fluorescencia; (Becton Dickinson) Bactec 960. (72,73)

El método Luminiscencia (expresión del gen luciferasa) utiliza cepas recombinantes de *M. bovis* (BCG) y *M. intracellulare* que expresan el gen de la enzima luciferasa de la luciérnaga. Los análisis se realizan en microplaca de 96 pozos. Este método permite el análisis rápido de la enzima luciferasa para detectar la actividad antituberculosa de extractos de plantas. Los controles y los extractos problemas son

muestreados inmediatamente después de la inoculación, y después de 3 días (*M.intracelulare* recombinante) y 5 días (rBCG) de incubación para medir la luminiscencia con un luminómetro, se calcula el cambio relativo en luminiscencia, reportándose como porcentaje. Los resultados sugieren que el análisis de la expresión de la luciferasa es rápido y exacto, además que posee un gran potencial de acelerar la evaluación de la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los extractos de plantas al trabajar con micobacterias de crecimiento rápido. Con este método es posible realizar el tamizaje de un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. También se puede trabajar con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y definir la concentración mínima inhibitoria (CMI) después de 21 días de incubación. (74, 75)

Microplate Assay Blue Alamar, MABA, presenta al azul de alamar como un indicador de potencial redox que mide la proporción de micobacterias que son resistentes a una o distintas concentraciones. Esto se debe al cambio de color provocado por la capacidad de las micobacterias viables para reducir el indicador presente en el medio de cultivo. A medida que crecen las micobacterias, el color del indicador cambia y el medio vira de azul a rosa intenso. Por el contrario, si la velocidad de crecimiento baja y con ello el metabolismo bacteriano, los microorganismos no reducen el indicador y no se observa un cambio en el color del medio. Por consiguiente, la intensidad del cambio de color indica el efecto de varias concentraciones de fármacos y metabolitos antituberculosos sobre la población de micobacterias presentes en los pocillos de la microplaca. El cromógeno del azul de alamar, llamado resazurina, se reduce a resofurina (rosa intenso) en el entorno reductor generado durante el metabolismo celular. Estos cambios de color se comparan con los de los cultivos de control que no recibieron el fármaco o con los que se lisaron por completo intencionalmente (cultivos no viables). Similar al sistema Bactec 460, MABA puede determinar tanto el porcentaje de inhibición a una concentración de interés como la concentración mínima inhibitoria (CMI) al utilizar un lector de microplacas para cuantificar permanencia del color azul (UV-Vis).

MABA cuesta menos que otros métodos y los resultados son inmediatos (4-8 días). Además, este procedimiento puede ser semiautomático con un microdiluidor. Este método ahora es ampliamente aceptado en los laboratorios de micobacteriología clínica porque es rápido, reproducible, económico y adecuado para su uso en la detección de actividad antituberculosa. (72,76)

Los métodos que utilizan sales de tetrazolio en microplaca, TEMA (por sus siglas en inglés, *Tetrazolium Microplate Assay*) utilizan sales de tetrazolio como indicador de viabilidad celular, las que reducirían a formazán. El costo del TEMA en comparación con MABA es menor, precisamente por el costo del indicador. Dentro de las sales que recientemente se han introducido al laboratorio de Micobacteriología Clínica se encuentra el 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. El viraje del color al violeta sucede cuando las micobacterias son metabólicamente activas, caso contrario el indicador permanece de color amarillo (75,76). Se reporta también el uso de sal disódica de tetrazolio: 2,3-bis-(2-metoxHtnitro-5-su1fofenil)-2H-tetrazolio-5-caitoxanilida para evaluar la actividad del hidrocloreuro de cryptolepina, aislado de la planta asiática *Cryptolepis sanguinolenta*, sobre micobacterias de crecimiento rápido, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. abcessus* y *M. aurum*. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se facilita por la adición de 20 µL de MTT después de la reincubación por 20 minutos. Se considera que el crecimiento es positivo por el viraje del indicador del amarillo al azul (79).

En el ensayo en microplacas con resazurina (REMA), la resazurina es un reactivo redox. Este indicador cambia de color azul (no fluorescente) cuando está en su estado oxidado a rosado intenso (fluorescente) frente a un entorno reductor como el generado durante el metabolismo celular, el cambio de color puede detectarse visualmente. Esta propiedad ha sido utilizada para medir la viabilidad de *Mycobacterium tuberculosis* luego de la exposición a las drogas antituberculosas. Es un método simple, rápido y de bajo costo que no requiere de equipamiento especial para su utilización. (80-82)

Recientemente se ha identificado a la resazurina como el principal componente del azul de alamar. (83,84)

Al ser la resazurina un producto que no se encuentra bajo licencia, es más económico que el azul de alamar y por tanto se vuelve asequible para laboratorios de escasos recursos económicos. (80,81)

### **2.2.6 *Piper carpunya* R & P**

#### **Clasificación taxonómica (Ver anexo 3,102)**

- REINO: PLANTAE
- CLASE: EQUISETOPSIDA
- SUBCLASE: MAGNOLIIDAE
- SUPERORDEN: MAGNOLIANAE
- ORDEN: PIPERALES
- FAMILIA: PIPERACEAE
- GENERO: *Piper*
- ESPECIE: *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

**Nombres comunes:** Carpundia, Condorcillo, Cordoncillo aromático u oloroso, Guaviduca, Guabiduca Dulce (85,86, 87, 89–91).

**Descripción:** Es una planta de unos 2-3 m de altura con un tronco nudoso y anillos horizontales en la corteza exterior. Las hojas son simples, alternas, dísticas, lanceoladas a elípticas, puntiagudas en el ápice, puntiagudas en la base, de 9-14 cm de largo, 4-7 cm de ancho y pecíolos de 8-10 mm de largo. Las inflorescencias,

que corresponden a espigas, son de color blanco a verde, erectas, de 7 a 11 cm de largo, 3 mm de diámetro y se agrupan densamente en bandas transversales con pedúnculos de 6-8 mm de longitud. Tiene pequeñas flores rodeadas de brácteas ovoides a redondas con extremos cortos y fimbriados; las anteras tienen tecas de 0,2 mm de largo y estigmas largos y sésiles (89).

**Distribución geográfica:** En Perú, la especie se originó en los departamentos de Amazonas, Huánuco y Cajamarca. Se encuentra ampliamente distribuida en las provincias de Azuay, Chimborazo, Napo, Pastaza y Pichincha, en Ecuador. También está presente en Colombia y Costa Rica (90-92).

**Composición química:** Se han realizado muchos estudios fitoquímicos que han llevado a aislar muchos metabolitos secundarios como alcaloides, lignanos, neolignanos, terpenoides, kavapironas, piperolidas, chalconas y dihidrochalconas, flavonas y flavanonas, que tienen alto potencial farmacológico. (116)

**Usos de la especie:** Las hojas son ampliamente utilizada en la medicina popular de los países tropicales y subtropicales de América del Sur como antiinflamatorio, antiulceroso, antidiarreico, antiparasitario y contra la irritación de la piel (93). Las hojas molidas se aplican sobre la herida actuando como agente antiinflamatorio. Además, se pueden usar para preparar 'caldo de carpundia', que se usa como agente digestivo, carminativo y antiflatulento. Los nativos toman infusiones de estas hojas para tratar los resfriados y el estreñimiento. También se usa para tratar la bronquitis (86).

### **2.2.7 *Piper peltatum* L.**

#### **Clasificación taxonómica (Ver anexo 2,102)**

- REINO: PLANTAE
- CLASE: EQUISETOPSIDA

- SUBCLASE: MAGNOLIIDAE
- SUPERORDEN: MAGNOLIANAE
- ORDEN: PIPERALES
- FAMILIA: PIPERACEAE
- GENERO: *Piper*
- ESPECIE: *Piper peltatum* L.

**Nombre común:** Feya, hoja santamaría, piquina, santamaría, ugudi bagasu, cordoncillo, corarnopan, caapeba, entre otros (103)

### **Hábitat**

Es una especie común en los sotobosques de bosques secundarios húmedos, o matorrales de tierras bajas húmedas, especialmente en regiones tropicales, en altitudes de alrededor de 600 a 1600 metros. Es originaria de México, América Central, las Antillas y América del Sur. (104)

### **Composición Química**

Tienen varios tipos de metabolitos secundarios, siendo la piperina (piperamida) uno de los compuestos fitoquímicos más destacados. Numerosos compuestos como amidas, lignanos, neolignanos, hidroquinonas, alcaloides, terpenos, compuestos oxigenados y derivados del ácido benzoico han sido aislados y caracterizados en esta especie. Además, es rico en compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas. (105)

### **Usos medicinales**

En cuanto a la actividad farmacológica, las sustancias peltatol A, B, C contenidas en *Piper peltatum* L. fueron capaces de inhibir la muerte celular inducida por el VIH-

1 a concentraciones subcitotóxicas de 1-10 µg/ml (106). Después del fraccionamiento cromatográfico, las fracciones obtenidas a partir de un extracto metanólico de dicha especie presenta actividad inhibitoria frente a tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens*. (107) Otro estudio concluyó que los extractos crudos de dicha especie inhiben la actividad miotóxica de fosfolipasas A2 (PLA2), aislados del veneno de serpientes Bothrops. (108)

En cuanto a su actividad antibacteriana, las hojas muestran actividad *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*. (109) Además, el extracto etanólico de sus hojas tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*. (16)

### **2.2.8 Piper amalago L.**

#### **Clasificación taxonómica (Ver anexo 1,102):**

- REINO: PLANTAE
- CLASE: EQUISETOPSIDA
- SUBCLASE: MAGNOLIIDAE
- SUPERORDEN: MAGNOLIANAE
- ORDEN: PIPERALES
- FAMILIA: PIPERACEAE
- GENERO: *Piper*
- ESPECIE: *Piper amalago* L.

**Nombres comunes:** Matico negro, Palo soldado, Condorcillo Chico. Lum Pom, Puchuch, Tzac al bak (Maya). (110)

#### **Descripción**

La planta mide unos 5 m de altura y tiene tallos retorcidos, lo que le da un aspecto articulado. En el lado opuesto de las hojas, hay erectas espigas de flores sin curvas, parecidas a colas de ratón. Las hojas son lanceoladas, elípticas u oblongas con un

ápice puntiagudo, de 4-14 cm de largo y 2-7 cm de ancho, y las nervaduras principales irradian desde la base de la hoja. Tiene pequeñas flores de color blanco a amarillo que se acomodan en forma de cadena. (45)

**Composición química:** Según estudios fitoquímicos, se ha descubierto que esta planta contiene abundante flavonoide y antraquinonas. Además hay presencia de taninos, compuestos fenólicos y triterpenoides y esteroides.(110)

### **Distribución geográfica**

Ampliamente distribuida en Centroamérica, incluyendo los países de Guatemala, El Salvador, Honduras, Panamá y Costa Rica. En Guatemala, la planta se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Petén, Quetzaltenango, Retalhuleu, Sacatepequez, San Marcos, Sololá, Suchitepequez y Zacapa. En El Salvador, se encuentra en los departamentos de Ahuachapan, La Libertad, La Paz, La Unión, Mozzarán, San Miguel, San Salvador, Santa Ana, Sonsonate y Usulután (47). En Perú, esta especie ha llegado a los departamentos de Amazonas y San Martín (27).

### **Usos de la especie**

En la medicina popular se ha utilizado como antiinflamatorio, analgésico, antipirético, diurético, cicatrizante, antihemorrágico, antibacteriano y alivio de problemas de pecho y estómago. Los jugos de las hojas y peciolos se administran en las heridas para curarlas. Además, los curanderos mayas lo utilizan tradicionalmente para tratar el síndrome cultural del "Susto", lo que llevó a estudios recientes que muestran que la planta tiene actividad ansiolítica. (110)

### 2.3 Definición de términos básicos

**Extracto:** Sustancia compuesta concentrada, obtenida por diferentes procedimientos de una parte de una planta con ayuda de un solvente.

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana.

**Bacilo:** Bacteria de forma cilíndrica alargada.

**Flora:** Conjunto de plantas, nativas o introducidas, de una región geográfica, de un período geológico determinado, o de un ecosistema determinado.

**Bioactividad:** Es la capacidad que tiene el material de interactuar químicamente con los tejidos (blandos y duros) del organismo.

**Antimicobacteriano:** Conjunto de compuestos que tienen la capacidad de eliminar o reducir la proliferación de micobacterias resistentes a fármacos, se requieren combinaciones de 2 o más compuestos.

**Nanopartículas:** Partículas microscópicas con un tamaño entre 1 y 100 nanómetros. Su principal objetivo de su uso es innovar y desarrollar nuevas herramientas y materiales en distintas áreas, como la medicina.

**MDR TB:** tuberculosis multirresistente (MDRO, por sus siglas en inglés) es un germen resistente a diversos antibióticos.

**XDR TB:** Es un tipo poco común de tuberculosis multirresistente (MDR TB). Es resistente a casi todos los medicamentos utilizados para tratar la tuberculosis, incluso los dos mejores medicamentos de primera elección: la isoniazida y la rifampicina.

**Agentes etiológicos:** Entidad biológica, física o química capaz de causar enfermedad.

## CAPITULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 3.1 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

#### 3.1.1 Hipótesis general

Los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro) presentan bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante el ensayo en microplacas con resazurina.

#### 3.1.2 Hipótesis específicas

- Los extractos etanólicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro) presentan bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante el ensayo en microplacas con resazurina.
- Los extractos clorofórmicos de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro) presentan bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante el ensayo en microplacas con resazurina.

### 3.2 IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

#### 3.2.1 Variable independiente

Extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (Carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (Matico negro).

#### 3.2.2 Variable dependiente

Bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

### 3.2.3 Operacionalización de variables

Variable independiente	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores	Unidad de medida/ puntos de corte
Extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&P. (Carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (Santa María) y <i>Piper amalago</i> L. (Matico negro)	El extracto etanólico y clorofórmico es el producto obtenido del proceso de maceración de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&P. (Carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (Santa María) y <i>Piper amalago</i> L. (Matico negro)	Concentración del extracto seco	Concentraciones de los extractos secos (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 µg/ml)	µg/ml
Variable dependiente	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores	Unidad de medida/ puntos de corte
Bioactividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Capacidad de los extractos vegetales para inhibir al <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	CMI ≤ 1000 µg/mL (bioactividad significativa)	µg/ml

**Fuente:** Elaboración propia

## **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **4.1 TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

#### **4.1.1 Tipo de investigación**

Experimental, transversal y prospectivo

#### **4.1.2 Nivel de investigación**

Explicativo

### **4.2 MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

#### **4.2.1 Método de investigación**

Deductivo

#### **4.2.2 Diseño de investigación**

Experimental

### **4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA DE INVESTIGACIÓN**

#### **4.3.1 Población**

*Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro)

#### **4.3.2 Muestra**

Extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de las especies *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro).

## **4.4 TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

### **4.4.1 Técnicas**

- a) Maceración etanólica y clorofórmica
- b) Evaporación rotativa
- c) Determinación de la concentración mínima inhibitoria de la muestra frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante lectura visual.

### **4.4.2 Instrumento**

Ensayo en microplacas con resazurina (REMA)

### **4.4.3 Procedimientos**

#### **1) Recolección de la especie**

Las hojas (droga) de las especies vegetales *Piper peltatum* L. (santa maría) y *Piper amalago* L. (matico negro) se recolectaron en el departamento de Amazonas, y las hojas (droga) de la especie vegetal *Piper carpunya* R&P. (carpunya) se recolectaron en el departamento de Cajamarca. Las especies de *Piper carpunya* R&P., *Piper peltatum* L. y *Piper amalago* L. fueron identificados por el Biólogo José Campos de la Cruz con C.B.P N° 3796. (ver anexos del 1 al 3)

#### **2) Estabilización de la droga**

La droga recolectada se acondicionó y se estabilizó en el laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” a temperatura ambiente y en sombra

aproximadamente por una semana. Una vez estabilizada la droga se sometió a un proceso de reducción de tamaño de partículas en un molino de cuchillas. (94)

### **3) Obtención de los extractos secos**

Se trabajó con la droga triturada de cada especie, en la proporción de 10 g de droga por 90 ml del solvente respectivo (94). La extracción se realizó por maceración a temperatura ambiente con etanol de 96° y cloroformo (14). Los solventes fueron eliminados por evaporación rotativa a una temperatura más baja de 40°C (94) y se obtuvieron los extractos secos, los cuales fueron almacenados en ambiente refrigerado.

### **4) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el ensayo en microplacas con resazurina**

Se realizó el bioensayo por triplicado de las muestras siguientes: extracto etanólico y clorofórmico de *Piper carpunya* R&P. (Carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (Matico negro) de acuerdo al protocolo original de Collins y Franzblau. (72,96)

#### **a) Preparación de las muestras para el ensayo en microplacas con resazurina**

Los extractos secos fueron disueltos en dimetilsulfóxido a la concentración de 200 mg/ml. La solución madre del extracto seco fue sometida a diluciones dobles seriadas, adaptando el esquema de diluciones de la Tabla N° 1, obteniendo 8 diluciones doblemente concentradas (diluciones 2x) para los 6 extractos, en el rango de 31.25 µg/ml - 4000 µg/ml. Las primeras diluciones 2x de los extractos secos (4000 µg/ml ) fueron esterilizados con filtros de jeringa 0.22 µm(14).

**Tabla N° 1. Diluciones de la solución madre (stock) del extracto seco, a partir de 200 mg/ml (200 000 µg/ml)**

Paso	Concentración inicial (µg/mL)	Fuente	Volumen(mL)	+	Caldo middlebrook 7H9 (mL)	Dilución final doblemente concentrada 2X (µg/mL)
1	200 000	stock	1		49	4 000
2	4 000	paso 1	0,5		0,5	2 000
3	4 000	paso 1	0,5		1,5	1 000
4	4 000	paso 1	0,5		3,5	500
5	500	paso 4	0,5		0,5	250
6	500	paso 4	0,5		1,5	125
7	500	paso 4	0,5		3,5	62,5
8	62,5	paso 7	0,5		0,5	31,25

**Fuente: Elaboración propia**

#### **b) Preparación de los controles negativos**

El control negativo utilizado para las pruebas fue isoniazida estándar (SIGMA-ALDRICH, ref. I3377-5G). La isoniazida es soluble en agua destilada estéril (94), se preparó a la concentración 1 mg/mL, se esterilizó con filtro de jeringa 0.22 µm y se almacenó a -20°C. Las concentraciones de los controles fueron de 0,031 – 1 µg/mL para la isoniazida estándar (95) en la microplaca, por ello, las diluciones finales doblemente concentradas (diluciones 2x) fueron de 0.062-2 µg/mL. (14,112)

#### **c) Preparación de la suspensión bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

La preparación de la suspensión de bacterias ajustada a la escala de Mac Farland N° 1 debe realizarse sólo en cabinas de bioseguridad clase II, tipo A2. Para la preparación de la suspensión bacteriana del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, se utilizó el protocolo del Instituto Nacional de Salud (97):

1. Mezclar 10 mL de agua destilada estéril y 40µL de Tween 80 al 10% en un tubo estéril (concentración final de Tween = 0.04%)

2. Tomar una asada de colonias de micobacterias y colocarlas en tubo estéril con perlas de vidrio (beads) que contenga 100  $\mu$ L de la solución salina Tween 80
3. Asegurar fuertemente la tapa del tubo y mezclar en el agitador 2-3 minutos; dejar reposar por 5 minutos
4. Abrir el tubo y añadir 3 mL de la solución agua – tween, asegurar la tapa del tubo y mezclar con agitación por 20 segundos
5. Reposar 30 minutos
6. Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril empleando pipeta de transferencia
7. Ajustar la turbidez a la escala 1 de Mac Farland (aprox. 3 x CFU/mL) con solución agua – tween.

#### **d) Preparación de solución de resazurina**

La solución madre de 0,01% de resazurina (SIGMA-ALDRICH, ref.R7017-5G) fue preparada disolviendo resazurina sódica en polvo en agua destilada. La solución se esterilizó con filtro de jeringa de 0.22  $\mu$ m y se almacenó a 4 ° C. (112)

#### **e) Procedimiento del ensayo en microplacas con resazurina con muestras de *Piper carpunya* R&P y *Piper peltatum* L.**

La distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de las microplacas de 96 pocillos (Tabla N°2). En los pozos correspondientes a las muestras (B3-E10), a los controles negativos con isoniazida (G3-G8), a los controles de esterilidad (B2-G2) y a los controles de crecimiento (B11-G11) se colocaron:

- 200  $\mu$ L de agua destilada estéril en el perímetro externo.
- 100  $\mu$ L de la dilución 2x de la muestra correspondiente a los pozos (B3-E10)
- 100  $\mu$ L de la dilución 2x de isoniazida correspondiente a los pozos (G3-G8)
- A los pozos de los controles de crecimiento (B11 – G11), se colocan 100  $\mu$ L de Caldo Middlebrook 7H9.

- A los pozos de los controles de esterilidad (B2-G2), se colocan 200 µL Caldo Middlebrook.
- 100 µL de la dilución 1:25 de la suspensión bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Caldo Middlebrook 7H9, excepto a los controles de esterilidad.

Las 8 concentraciones finales de las muestras estuvieron en el rango de 15,63 µg/mL -2000 µg/mL.

Se incubó por 7 días a 37° C. Al octavo día, se colocó 30 µL de solución de resazurina al primer pozo de control de crecimiento (B11). Después de 24 horas, se observó el viraje a color rosado. Una vez visto el cambio de color, se procedió a colocar la solución de resazurina a los demás pozos. Después de 24 horas, se observó los resultados finales. (112)

**Tabla 2. Diseño de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Piper carpubya* R&P y *Piper peltatum* L., mediante el ensayo en microplacas con resazurina**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	H <sub>2</sub> O												
<b>B</b>	H <sub>2</sub> O	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	CC	H <sub>2</sub> O	<b>M1</b>
<b>C</b>	H <sub>2</sub> O	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	CC	H <sub>2</sub> O	<b>M2</b>
<b>D</b>	H <sub>2</sub> O	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	CC	H <sub>2</sub> O	<b>M3</b>
<b>E</b>	H <sub>2</sub> O	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	CC	H <sub>2</sub> O	<b>M4</b>
<b>F</b>	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O	
<b>G</b>	H <sub>2</sub> O	CE	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031			CC	H <sub>2</sub> O	<b>I</b>
<b>H</b>	H <sub>2</sub> O												

M1: Extracto etanólico de *Piper carpunya* R & P  
M2: Extracto clorofórmico de *Piper carpunya* R & P  
M3: Extracto etanólico de *Piper peltatum* L.  
M4: Extracto clorofórmico de *Piper peltatum* L.  
I: Isoniazida  
CE: Control de esterilidad CC: Control de crecimiento

**Fuente:** Elaboración propia

**f) Procedimiento del ensayo en microplacas con resazurina con muestras de *Piper amalago* L.**

La distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de las microplacas de 96 pocillos (Tabla N°3). En los pozos correspondientes a las muestras (B3-C10), a los controles negativos con isoniazida (G3-G8), a los controles de esterilidad (B2-G2) y a los controles de crecimiento (B11-G11) se colocaron:

- 200 µL de agua destilada estéril en el perímetro externo.
- 100 µL de la dilución 2x de la muestra correspondiente a los pozos (B3-C10)
- 100 µL de la dilución 2x de isoniazida correspondiente a los pozos (G3-G8)
- A los pozos de los controles de crecimiento (B11 – G11), se colocan 100 µL de Caldo Middlebrook 7H9.
- A los pozos de los controles de esterilidad (B2-G2), se colocan 200 µL Caldo Middlebrook.
- 100 µL de la dilución 1:25 de la suspensión bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en Caldo Middlebrook 7H9, excepto a los controles de esterilidad.

Las 8 concentraciones finales de las muestras estuvieron en el rango de 15,63 µg/mL -2000 µg/mL.

Se incubó por 7 días a 37° C. Al octavo día, se colocó 30 µL de solución de resazurina al primer pozo de control de crecimiento (B11). Después de 24 horas, se

observó el viraje a color rosado. Una vez visto el cambio de color, se procedió a colocar la solución de resazurina a los demás pozos. Después de 24 horas, se observó los resultados finales. (112)

**Tabla 3. Diseño de la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Piper amalago* L., mediante el ensayo en microplacas con resazurina**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	H <sub>2</sub> O												
<b>B</b>	H <sub>2</sub> O	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	CC	H <sub>2</sub> O	<b>M5</b>
<b>C</b>	H <sub>2</sub> O	CE	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	CC	H <sub>2</sub> O	<b>M6</b>
<b>D</b>	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O	
<b>E</b>	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O	
<b>F</b>	H <sub>2</sub> O											H <sub>2</sub> O	
<b>G</b>	H <sub>2</sub> O	CE	1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031			CC	H <sub>2</sub> O	<b>I</b>
<b>H</b>	H <sub>2</sub> O												

M5: Extracto etanólico de *Piper amalago* L.

M6: Extracto clorofórmico de *Piper amalago* L.

I: Isoniazida

CE: Control de esterilidad CC: Control de crecimiento

**Fuente:** Elaboración propia

### **e) Lectura de los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La lectura de resultados se realizó visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado se registró como positivo. La concentración más baja del extracto seco frente el *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en la que no se produce el cambio de color, se tomará como el valor de CMI. Para una correcta lectura se siguió las recomendaciones de Wiegand I. y col. (98,99)

### **f) Interpretación de resultados**

Para la interpretación de los resultados se tomó los parámetros de Holetz FB. y col. (100). Se consideró que los extractos poseen bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cuando el CMI  $\leq$  1000  $\mu\text{g/mL}$ . La bioactividad significativa se clasifica de la manera siguiente:

- Débil bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: CMI de 500 a 1000  $\mu\text{g/mL}$
- Moderada bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: CMI de 100 a < 500  $\mu\text{g/mL}$
- Buena bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: CMI < 100  $\mu\text{g/mL}$

## CAPITULO V: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

#### 5.1.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el ensayo en microplacas con resazurina

Las muestras consideradas para el siguiente ensayo fueron: los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Piper carpunya* R&P. (CARPUNYA), *Piper peltatum* L. (SANTA MARÍA) y *Piper amalago* L. (MATICO NEGRO).

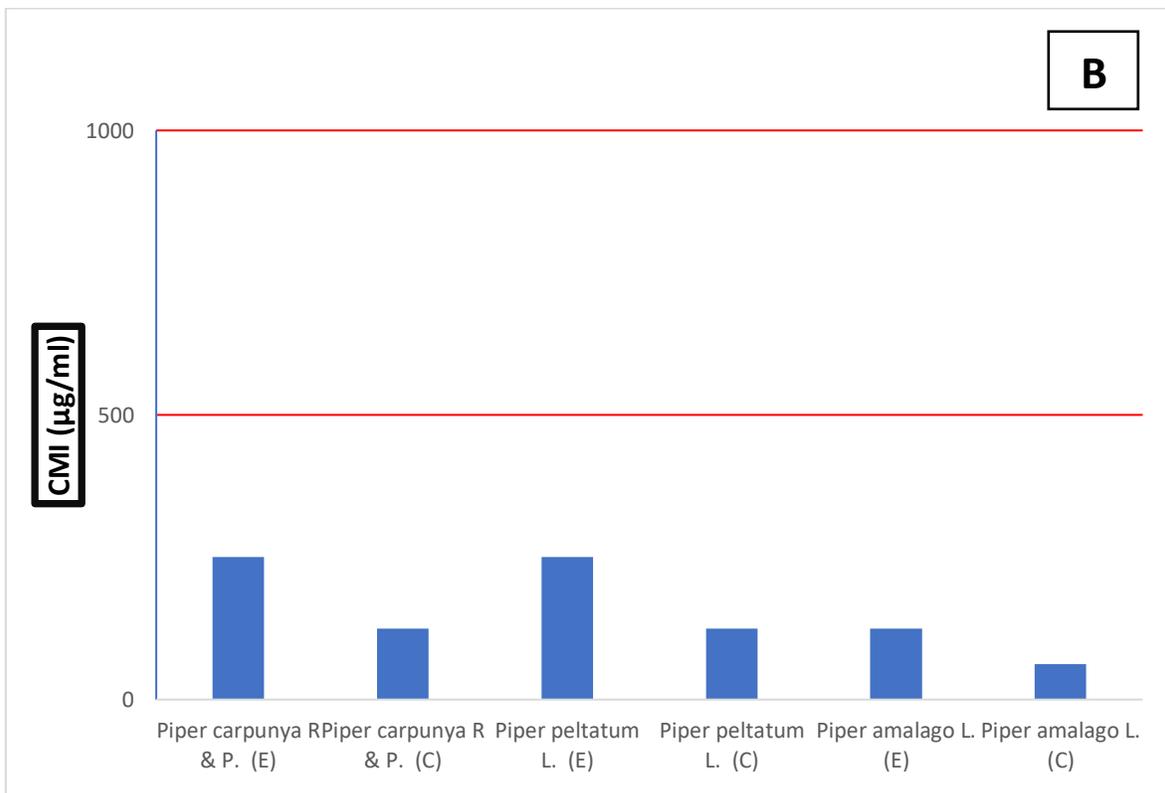
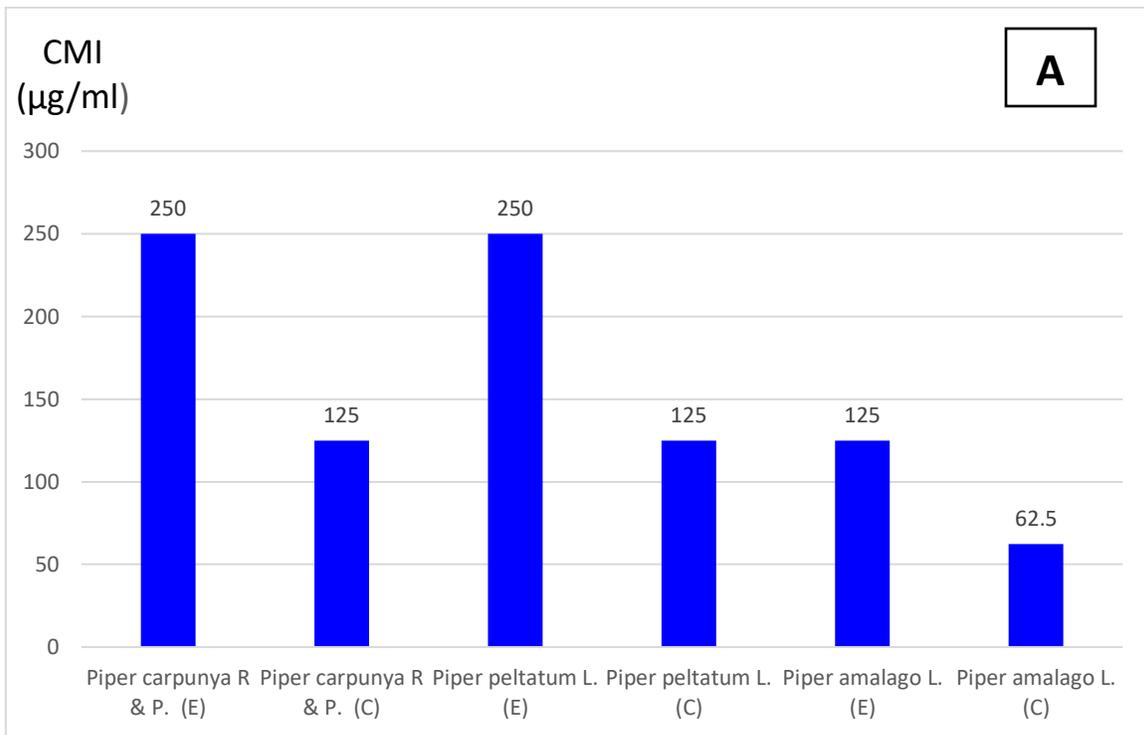
Los resultados de la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) por el ensayo en microplacas con rezasurina se presentan en la Tabla 4 y las figuras 1 a 3.

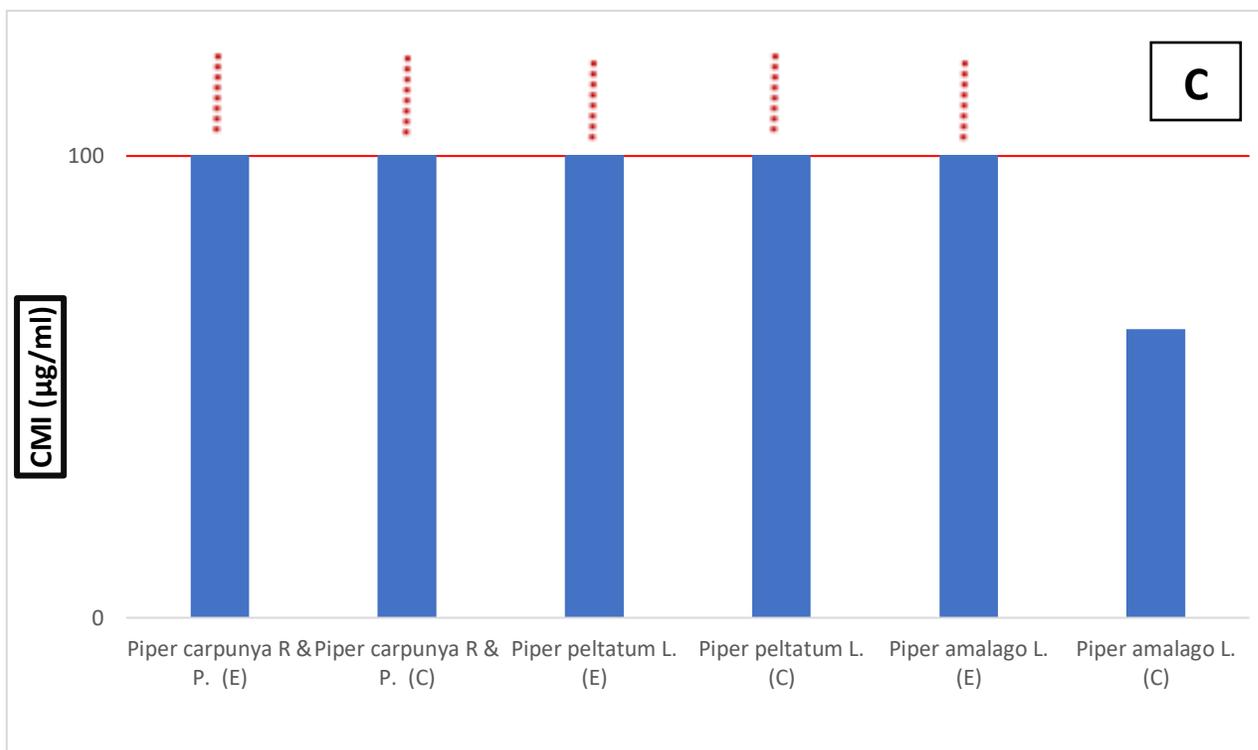
En la tabla 4 y la figura 1 se observa que los 6 extractos estudiados (100%) tienen un CMI  $\leq$  1000  $\mu\text{g/ml}$ . Además, se observa que 5 (83.33%) de los 6 extractos estudiados tienen  $100 \leq \text{CMI} < 500 \mu\text{g/ml}$ . Finalmente, se observa que 1 (16.67%) de los 6 extractos estudiados tiene CMI  $< 100 \mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 4 .Valores de la Concentración Mínima inhibitoria sobre Mycobacterium tuberculosis H37Rv**

	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) $\mu\text{g/ml}$
<i>Piper carpunya</i> R & P. (E)	250
<i>Piper carpunya</i> R & P. (C)	125
<i>Piper peltatum</i> L. (E)	250
<i>Piper peltatum</i> L. (C)	125
<i>Piper amalago</i> L. (E)	125
<i>Piper amalago</i> L. (C)	62,5

**E: Extracto etanólico C: Extracto clorofórmico**





**CMI: Concentración Mínima Inhibitoria E: Extracto etanólico C: Extracto clorofórmico**

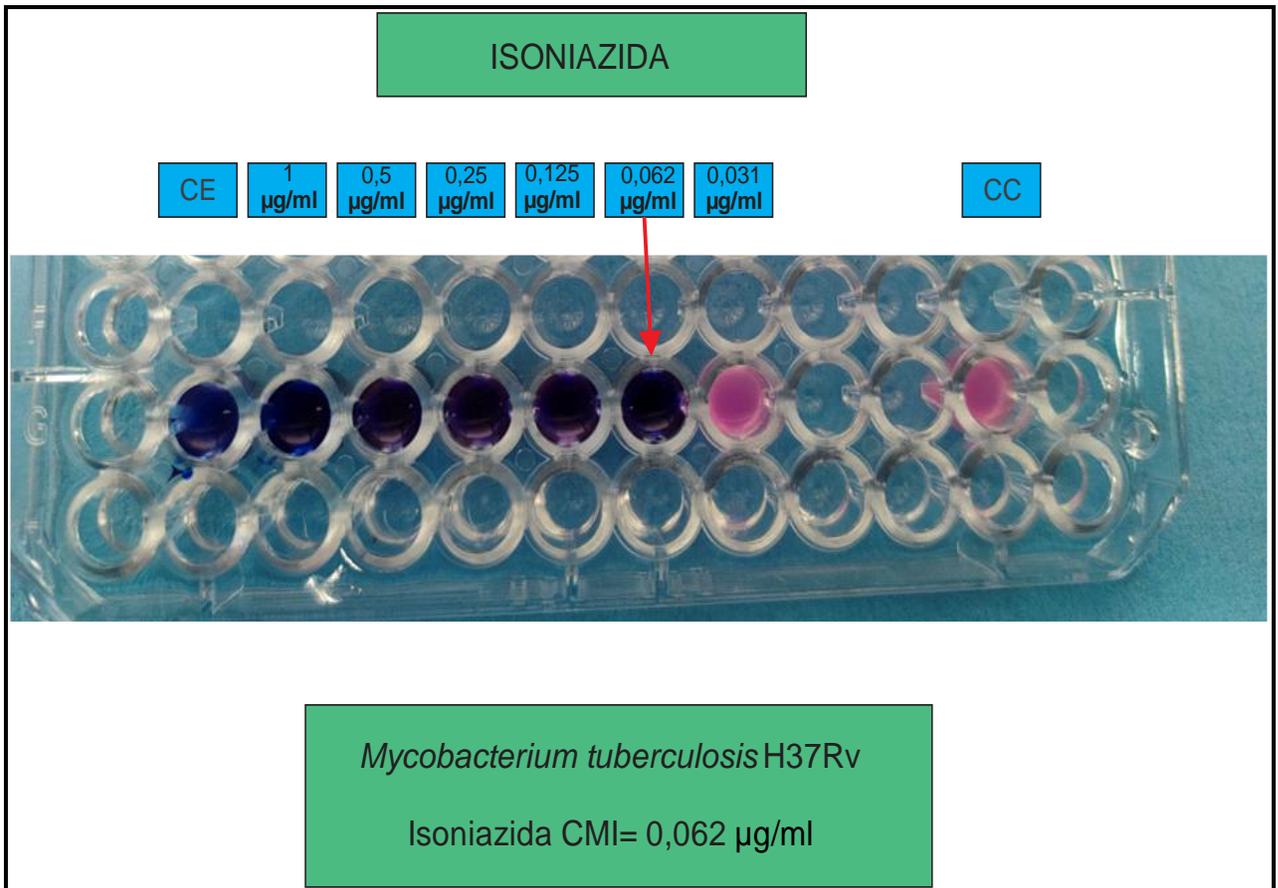
**Figura 1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las plantas en estudio sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.**

Leyenda: En el eje de las ordenadas se ubica a la CMI en µg/ml, y en el eje de abscisas se ubicaron los extractos secos de las plantas en estudio

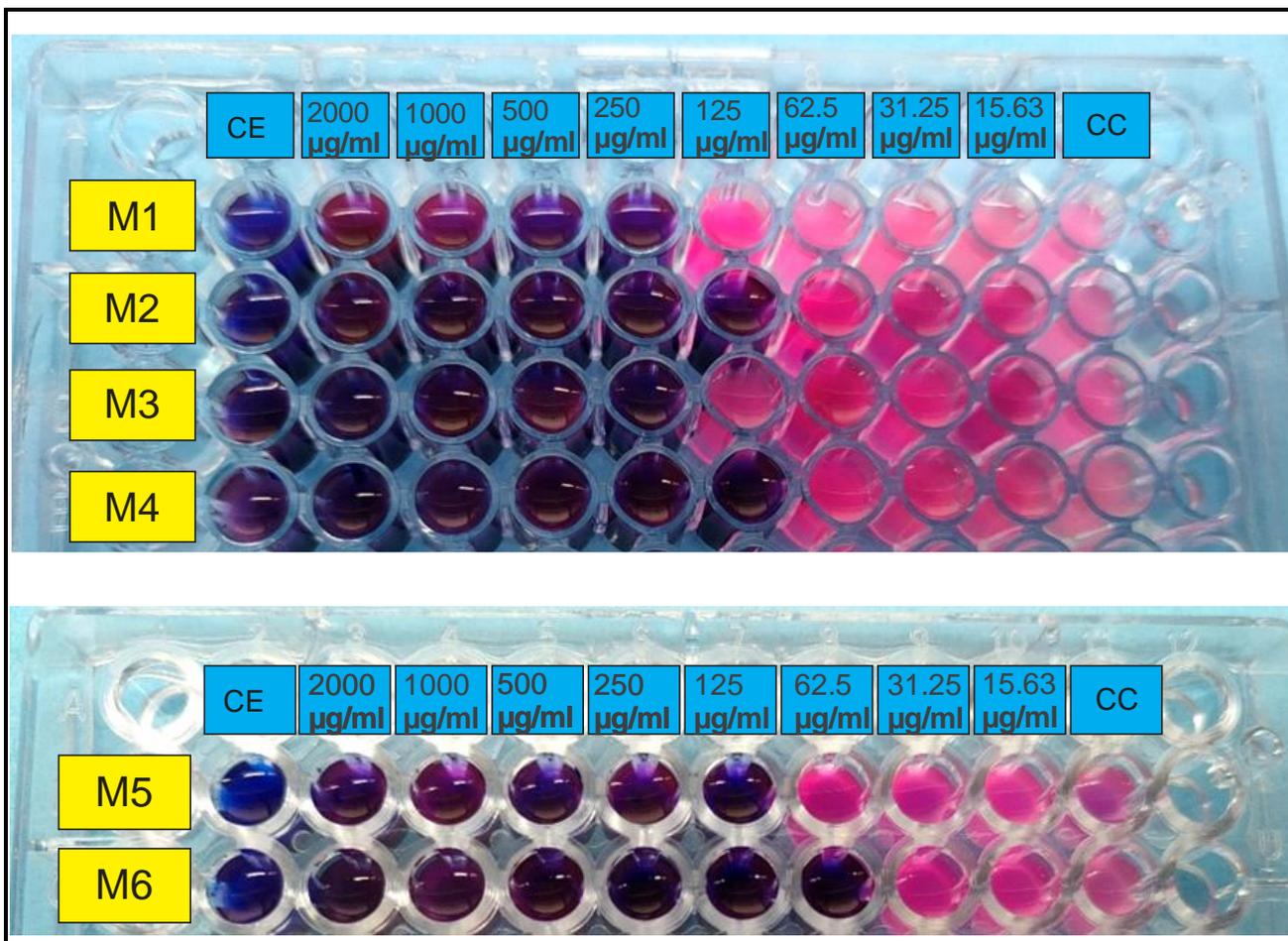
A: Representación general en diagrama de barras del CMI de los extractos secos

B: Escala de ordenadas llega hasta 1000 µg/ml

C: Escala de ordenadas llega hasta 100 µg/ml



**Figura 2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del control negativo Isoniazida por el ensayo en microplacas con resazurina**



M1: Extracto etanólico de *Piper carpunya* R & P  
M2: Extracto clorofórmico de *Piper carpunya* R & P  
M3: Extracto etanólico de *Piper peltatum* L.  
M4: Extracto clorofórmico de *Piper peltatum* L.  
M5: Extracto etanólico de *Piper amalago* L.  
M6: Extracto clorofórmico de *Piper alamago* L.

CE: Control de esterilidad  
CC: Control de crecimiento

**Figura 3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos estudiados por el ensayo en microplacas con rezasurina, toma fotográfica en el Laboratorio Referencial de Tuberculosis DIRESA-CALLAO.**

## CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

### 6.1 DISCUSIÓN DE INVESTIGACIÓN

Los resultados del ensayo antimicobacteriano basado en la reducción de la rezasurina han demostrado que el 100% de los 6 extractos estudiados: los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Piper carpunya* R&P. (CARPUNYA), *Piper peltatum* L. (SANTA MARÍA) y *Piper amalago* L. (MATICO NEGRO), poseen bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv siguiendo los parámetros de Holetz FB. y col. (100), que avala el potencial antituberculoso que tienen las 3 especies vegetales seleccionadas en base a su estudio quimiotaxonómico.

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 6 extractos estudiados, que indicó que el extracto etanólico de *Piper carpunya* R & P, el extracto clorofórmico de *Piper carpunya* R & P, el extracto etanólico de *Piper peltatum* L., el extracto clorofórmico de *Piper peltatum* L y el extracto etanólico de *Piper amalago* L., poseen  $100 \leq \text{CMI} < 500 \mu\text{g/ml}$ , por lo que son extractos con moderada bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Además, se determinó que el extracto clorofórmico de *Piper amalago* L. posee un  $\text{CMI} < 100 \mu\text{g/ml}$ , por lo que es el único extracto con buena bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, siguiendo los parámetros de Holetz FB. y col (100).

#### ***Piper carpunya* R & P**

La bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv del extracto etanólico de las hojas de *Piper carpunya* R & P es significativa y moderada (100) ( $\text{CMI} = 250$ ) y del extracto clorofórmico de las hojas de *Piper carpunya* R & P es significativa y moderada (100) ( $\text{CMI} = 125 \mu\text{g/ml}$ ). Algunos estudios orientativos sobre la actividad antibacteriana como el de Salamanca S. y Galiano M. (110) demuestra que los extractos etanólicos de hojas de *Piper carpunya* R & P tienen buena actividad

antibacteriana contra una bacteria gram-positiva como el *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, entonces esto nos da una idea de su posible potencial contra otra bacteria que tiene estructura gram-positiva como el *Mycobacterium tuberculosis*. Otro estudio orientativo como el de Gonzales et al. (115) demuestra que los aceites esenciales presentes en las hojas de *Piper carpunya* R & P. tuvieron buena bioactividad antibacteriana contra una bacteria gram-positiva llamada *Staphylococcus aureus* y contra una bacteria gram-negativa llamada *E. coli*. Aquí observamos del gran potencial antibacteriano de la hoja de *Piper carpunya* R & P para poder estudiar su posible efecto antituberculoso de forma más específica.

Según Baquero et al. (16), el extracto etanólico de hojas de *Piper hispidum* y *Piper auriculatum* no tienen bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a concentración de 128 µg/ml. Se puede interpretar que la CMI de estos extractos serían > 128 µg/ml, lo cual concuerda con CMI del extracto etanólico de las hojas de *Piper carpunya* R & P frente a *Mycobacterium tuberculosis* obtenido en el presente estudio (CMI =250 µg/ml). Otro resultado de Baquero et al. (16), es que el extracto de la madera de *Piper hispidum* tiene bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a concentración de 128 µg/ml. Se puede interpretar que la CMI de este extracto sería ≤ 128 µg/ml, lo que concuerda con el resultado obtenido en el presente estudio con respecto al extracto clorofórmico de las hojas de *Piper carpunya* R & P frente a *Mycobacterium tuberculosis* obtenido en el presente estudio (CMI =125 µg/ml). Las comparaciones se hacen desde un punto de vista de la quimiotaxonomía ya que todos pertenecen al género Piper y poseen metabolitos secundarios similares. Baquero et al.(16), atribuyen el poder antituberculoso al género Piper por las moléculas bioactivas como piperina (CMI = 50 µg/ml), la 5,6-dehidro-7,8-dihidrometisticina (CMI 4 µg/ml), el 2-oxo-14-(3',4'-metilendioxfenil) tetradecano (CMI 6.25 µg/ml), entre otros.

### ***Piper peltatum* L.**

La bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv del extracto etanólico de las hojas de *Piper peltatum* L. es significativa y moderada (100) (CMI =250) y del extracto clorofórmico de las hojas de *Piper peltatum* L. es significativa y moderada (100) (CMI = 125 µg/ml).

Según Baquero et al. (16), el extracto etanólico de hojas de *Piper peltatum* no tiene bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a concentración de 128 µg/ml. Se puede interpretar que la CMI de este extracto sería > 128 µg/ml. Este dato coincide con el resultado obtenido en el presente estudio del extracto etanólico de las hojas de *Piper peltatum* L. (CMI =250).

Según Jiménez et al (18), los extractos de una mezcla diclorometano: metanol (1:1) de tallos y de las hojas de *Piper sanctum*, que a concentración de 100 µg/mL tiene bioactividad antituberculosa significativa. Se puede interpretar que la CMI de este extracto sería ≤ 100 µg/ml. Este dato es similar al resultado obtenido del extracto clorofórmico de las hojas de *Piper carpunya* R & P frente a *Mycobacterium tuberculosis* en el presente estudio (CMI =125 µg/ml), otro rasgo que coincide aquí son los solventes utilizados en ambos ensayos que son disolventes apolares (diclorometano y cloroformo), con la diferencia en que Jimenez et al reportan el uso conjunto en el estudio del diclorometano mezclado con un disolvente polar prático como el metanol para poder extraer más metabolitos secundarios polares a la muestras utilizadas. Cabe recalcar que si se es riguroso en el análisis tanto el diclorometano como el cloroformo a pesar de ser solventes apolares tienen cierto grado de polaridad.

### ***Piper amalago* L.**

La bioactividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv del extracto etanólico de las hojas de *Piper amalago* L. es significativa y moderada (100) (CMI =125) y del extracto clorofórmico de las hojas de *Piper amalago* L. es significativa y buena (100)

(CMI = 62,5 µg/ml). Algunos estudios orientativos sobre la actividad antibacteriana como el de Salamanca S. y Galiano M. (110) demuestra que los extractos etanólicos de hojas de *Piper amalago* L. presentaron buena actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*, entonces esto da una idea de su posible potencial contra otras bacterias que tiene estructura gram-positiva como el *Mycobacterium tuberculosis*.

Estudios científicos de plantas Piper con buena bioactividad significativa antituberculosa (100), son los siguientes:

Phongpaichit et al.(113), determinaron la concentración mínima inhibitoria del extracto clorofórmico de frutos de *Piper chaba* frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra que resultó 16 µg/ml. También determinaron que el extracto clorofórmico de las hojas de *Piper betle* tuvo CMI de 62.5 µg/ml frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Laurentiz et al (114), determinaron la concentración mínima inhibitoria de 2 lignanos procedente del extracto etanólico de semillas de *Piper cubeba* frente a *Mycobacterium tuberculosis* que resultaron 62,5 µg/ml. Gonzalo G y Ramos R (14), determinaron la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que resultó 31,25 µg/ml. Hussain et al (17), determinaron que el CMI de los extractos acuosos y etanólicos de las diferentes partes de *Piper sarmentosum* frente a *Mycobacterium tuberculosis* fue 12.5 µg/ml. De los seis datos mostrados de antecedentes científicos al presente estudio, tres datos del CMI concuerdan al resultado obtenido del extracto clorofórmico de las hojas de *Piper amalago* L. frente a *Mycobacterium tuberculosis* en el presente estudio (CMI =62.5 µg/ml), un dato del CMI (31,25 µg/ml) es cercano al resultado del presente estudio y los otros dos datos del CMI (12.5 µg/ml y 16 µg/ml) son algo lejanos. Phongpaichit et al.(113), reportan que en su estudio encontraron que la Piperina es uno de los metabolitos secundarios principales en el extracto clorofórmico de frutos de *Piper chaba*, el CMI obtenido de piperina frente *M. tuberculosis* resultó ser 50 µg/ml, que es 3 veces más alto que el del extracto

clorofórmico. Piperina es uno de los mayores componentes de las plantas Piper. Esto exhibe que estas plantas tienen grandes efectos antituberculosos. Es probable que el gran potencial antituberculoso de la especie vegetal *Piper amalago* L se deba a la piperina.

### **Isoniazida estándar**

Según Montelongo – Peralta (122), la CMI para *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fueron 0.062 µg/ml para isoniazida con el ensayo MABA. Este valor coincidió con el resultado obtenido en el presente estudio con el control negativo isoniazida estándar (SIGMA-ALDRICH, ref. I3377-5G).

### **Ensayo en microplacas con resazurina**

El ensayo en microplacas con azul de alamar ha sido estandarizado por Collins y Franzblau (72). La resazurina es el principio activo del azul de alamar. La lectura se puede realizar de 2 maneras utilizando la lectura espectrofotométrica o por lectura colorimétrica; en esta tesis, se prefirió usar la lectura colorimétrica respecto a la espectrofotométrica por limitaciones de equipamiento y por aspecto económico, pero mostrando resultados reproducibles, como se reporta en otros estudios similares para especies vegetales: Langfield RD et al. (118) y Sarker SD et al. (119) para bacterias.

Con respecto al número de bacterias por mililitro (UFC) del inóculo del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, no significó ningún inconveniente debido a que se trabajó siguiendo el protocolo original de Collins y Franzblau (72) y el protocolo del Instituto Nacional de Salud (97) para la preparación de la suspensión bacteriana del *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ajustada a la escala de Mac Farland N° 1.

Con respecto al uso de indicadores colorimétricos, se puede usar para el ensayo biológico, sales de tetrazolio (17,63), azul de alamar (14) y resazurina (112). En el presente estudio se utilizó resazurina que tiene la ventaja de ser un colorante poco tóxico para las células, y permite la continuidad de estudios en las mismas células,

economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y apreciadas (120) ; a diferencia de las sales de tetrazolio que según los nuevos estudios han demostrado ser poco fiable por tener muchas interacciones no deseadas que afectan los resultados en el ensayo MTT, esto se a que la estructura celular y sus diferentes sustancias pueden hacer interacciones con el tetrazolio (121). La diferencia entre azul de alamar y resazurina es principalmente el costo, y además que el azul de alamar viene preparado en forma líquida y la resazurina viene en polvo para preparar.

Respecto a la cantidad utilizada de resazurina en los ensayos utilizado en el presente estudio, se toma en cuenta la preparación descrita por Rivoire et al (112); la cantidad usada de solución de resazurina fue 30  $\mu$ L por pocillo en el ensayo biológico usado. Según Gonzalo G y Ramos R (14) el azul de alamar (INVITROGEN) tiene un factor de dilución 10x con respecto a la solución conjunta de muestra, la micobacteria y el medio de cultivo (200  $\mu$ L), por ello se añade 20  $\mu$ L en el ensayo. Se ve una pequeña diferencia con respecto al volumen usado en el presente estudio de la solución de resazurina, puede deberse a una diferencia en la tasa de reacción de cada reactivo con respecto a la cadena respiratoria del *Mycobacterium tuberculosis* por la estabilidad de ambos reactivos ya que la solución de resazurina preparada es estable hasta máximo por una semana (112), mientras el azul de alamar al venir preparado es estable mientras esté en su frasco respetando la fecha de caducidad.

Para fines de la tesis, se utilizó la resazurina porque es una técnica barata, sencilla y con buenos resultados de sensibilidad y especificidad.

## CONCLUSIONES

1. Se cumplió con el objetivo general de determinar la bioactividad significativa de los extractos etanólicos y clorofórmicos sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de las hojas de las especies vegetales *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (matico negro).
2. Se determinó que el 100% de los 6 extractos estudiados (3 extractos etanólicos y 3 extractos clorofórmicos) de las especies vegetales *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (matico negro) presentaron bioactividad significativa sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (CMI  $\leq$ 1000  $\mu$ g/mL).
3. Se determinó que 5 (83,33%) de los 6 extractos estudiados de las especies vegetales *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (matico negro), presentaron bioactividad significativa y moderada sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ( $100 \leq$ CMI  $<$ 500  $\mu$ g/ml).
4. Uno (16.67%) de los 6 extractos estudiados de las especies vegetales *Piper carpunya* R&P. (carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (matico negro) presentó CMI  $<$  100  $\mu$ g/mL. El único extracto con bioactividad significativa y buena sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, según los parámetros de parámetros de Holetz FB. y col. (100), fue el extracto clorofórmico de las hojas de *Piper amalago* L (CMI  $<$  100  $\mu$ g/mL). Esta especie vegetal es una gran alternativa de extractos y metabolitos antituberculosos.

## RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de los diferentes metabolitos secundarios con efectos antituberculosos presentes en el extracto clorofórmico de *Piper amalago* L. Sobre todo en alcaloides como la piperina y en los lignanos que tienen mucho potencial antituberculoso en las especies vegetales del género Piper.
2. Utilizar otros solventes o mezclas de solventes teniendo en cuenta su grado de polaridad para realizar extractos de diferentes partes de una especie vegetal, con el fin de extraer metabolitos más específicos y con polaridades peculiares.
3. Tomar en cuenta otras partes de las especies vegetales para realizar el estudio antituberculoso como el tallo, los rizomas, los frutos, etc.
4. Tomar en cuenta que la resazurina si bien es un producto muy económico también tiene desventajas como la generación de aerosoles biocontaminantes y se puede producir contaminación de bacilos de un pocillo a otro en la microplaca usada en el ensayo REMA. Así que se tiene que ser muy prolijo en todos los procedimientos.
5. Seguir buscando nuevas especies del género Piper presentes en el Perú, tratando de indagar los usos tradicionales *in situ* de comunidades nativas contra la tuberculosis o infecciones bacterianas.

## FUENTES DE INFORMACIÓN

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020 [en línea]. Ginebra: WHO; 2021. [citado 24 junio 2022]; Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340396/9789240022652-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Rios J, Recios M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* [en línea] 2005 [citado: 26 junio 2021]; 100(1-2): [80-84pp] Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15964727/>
3. Copp B. Antimycobacterial natural product. *Natural Products Report* [en línea] 2003. Diciembre; 20: [535-557 pp.] Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14700198/>
4. Okunade A, Elvin - Lewis M, Lewis W. Natural antimycobacterial metabolites [en línea] 2004. Abril [citado: 22 junio 2021]; 65: [1017-1032 pp.] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003194220400086X>
5. Análisis de la situación de salud del distrito de San Juan de Lurigancho 2019, [en línea]. Ministerio de Salud, Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades; 2015. Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis-lima-2019/CD\\_MINSA/DOCUMENTOS\\_ASIS/ASIS\\_DISTRITO%20SAN%20JUAN%20LURIGANCHO%202019.pdf](https://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis-lima-2019/CD_MINSA/DOCUMENTOS_ASIS/ASIS_DISTRITO%20SAN%20JUAN%20LURIGANCHO%202019.pdf)
6. Análisis de la situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú, 2015, [en línea]. Ministerio de Salud, Dirección General de Epidemiología; 2016. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/389422/analisis-de-la-situacion-epidemiologica-de-la-tuberculosis-en-el-peru-2015.pdf>
7. Termentzi A., Fokialakis N, Skaltsounis AL. Natural resins and bioactive natural products thereof as potential antimicrobial agents. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (13): 1267-90.
8. Desmarchelier C, Witting F. *Etnomedicina y bioactividad* [en línea] Lima; sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon, ecology, ethnomedicine and bioactivity; 2000. [citado 21 junio 2021] Disponible en:

<https://www.herbalgram.org/resources/herbalgram/issues/52/table-of-contents/article2253/>

9. Principales causas de mortalidad por sexo Perú, año 2014 [en línea]. Ministerio de Salud, Oficina General de Tecnologías de la Información; 2015. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/estadisticas/estadisticas/mortalidad/macros.aspx?00>.
10. Ministerio de Salud -Dirección general de Epidemiología. Carga de enfermedad en el Perú, estimación de los años de vida saludables perdidos 2012 [en línea]. Lima: USAID; 2012] Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/Cargaenfermedad2012.pdf>.
11. Ministerio de Salud. Impacto socioeconómico de la Tuberculosis en el Perú 2010: documento técnico [en línea]. Lima: Ministerio de Salud; 2012. [Citado el 3 de julio de 2016] Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1820.pdf>
12. Lemus, D., Montoro, E., Echemendía, M., Yzquierdo, S. L., Martín, A., Portaels, F., & Palomino, J. C. (2005). Nuevos métodos para la detección rápida de la resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*.
13. Alvarado J., Vásquez H., Delgado G., Trevisan D., Horna O. et al. Actividad inhibitoria de plantas in vitro de *Drosera capillaris* sobre *Mycobacterium tuberculosis*. Perú: Rev. Peru. Biol; 2010.
14. Ramos R. y Gonzalo G. Estudio de la actividad antituberculosa de los extractos, alcaloides y flavonoides de las especies *Juglans neotropica* Diels., *Piper aduncum* L., *Croton lechleri* Müll. Arg., *Lantana camara* L., *Annona cherimola* Mill, *Annona muricata* L. y *Jatropha gossypifolia* L. frente a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, mediante el ensayo en microplacas con azul de alamar. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: UNMSM; 2014 [citado 20 de junio 2021] Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10881>
15. Pajares A. y Steban J. Actividad antibacteriana in vitro de las nanopartículas del rizoma de *Curcuma longa*, mediante el método MODS modificado sobre el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [Tesis para obtener el título profesional de Biólogo-Microbiólogo]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2017 [citado 23 de junio de 2021]. Disponible en:

<https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10859/Arica%20Pajaros%2c%20Javier%20Steban.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

16. Baquero E., Benavides J., Sepúlveda L., Quiñones W. et al. Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana [en línea] 2007. Abril [Citada: 24 junio 2021]; 3(33): [133-136 pp] Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84903331.pdf>
17. Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, Ibrahim P. Antioxidant, anti-TB activities, phenolic and amide contents of standardised extracts of *Piper sarmentosum* Roxb [en línea] 2009. Octubre [Citada: 23 junio 2021]; 23(3): [238-249pp.] Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786410801987597>
18. Jimenez M., Cornejo J., Leon R. Las plantas medicinales mexicanas como fuente de compuesto antimicobacterianos [en línea] 2010. Enero-marzo [Citada: 24 de junio 2021]; (41): [22-29 pp.] Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57912960003.pdf>
19. Wang J, Behr MA. Building a better bacillus: the emergence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol.* 2014; 3: 5:139 pp.
20. Rastogi N, Legrand E., Sola C. The Mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev Schi Tech Off Int Epiz.* 2001; 20: 21-54 pp.
21. Leao S, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo JC, Telles MA. Practical Handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broele, Belgium; 2004.
22. Aranaz A, Liebana E, Gómez-Mampaso E, Galan JC, Cousins D, Ortega A. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. Caprae. Subsp. Nov: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49: 1263-73 pp.
23. Pfyffer GE, Auckenthaler R, Van Embden JD, Van Soolingen D. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swis patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:631-4 pp.
24. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S. Tuberculosis

- in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:1305-14 pp.
25. Sehgal VN, Bhattacharya SN, Jain S, Logani K. Cutaneous tuberculosis: the evolving scenario. *Int J Dermatol.* 1994; 33:97-104 pp.
  26. Skerman VB, McGowan V, Sneath PH. Approved list of bacterial names. *Intern J. Sistematic Bacteriol* 1980; 30:225-420 pp.
  27. Parsons LM, Driscoll JR, Taber HW, Salfinger M. Drug resistance in Tuberculosis. *Infect Dis Clin North Am.* 1997; 11:905-28 pp.
  28. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2003; 83:91-7 pp.
  29. Draper P. The structure of the mycobacterial cell envelope is not yet understood. *Res Microbiol* 1991; 42:420-2 pp.
  30. Grange JM. The biology of the genus *Mycobacterium*. *J Appl Bacteriol Supl* 1996; 81:1-9 pp.
  31. Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. USA: Blackwell Publishing Ltd; *Cellular Microbiology* 2004; 6(2); 105-116 pp.
  32. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16:463-96. .
  33. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, and Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *International Journal of Medical Microbiology.* 2000; 290 (2): 143-152 pp.
  34. Cole S, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998; 393:537-544 pp.
  35. Wheeler PR and Ratledge C. Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis in: Pathogenesis, Protection, and Control.* B. R. Bloom, Ed., American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, 1994. 353–385 pp,

36. Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, Brennan PJ, and Jackson M. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Advances in Applied Microbiology*. 2009; 69: 23-78 pp.
37. Neyrolles O and Guilhot C. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis*. 2011; 91(3): 187-195 pp.
38. Murphy DJ and Brown JR. Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infectious Diseases*. 2007; 7: (Versión electrónica)
39. Gey Van Pittius NC, Gamielien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, and Beyers AD. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biology*. 2001; 2 (10): (Versión electrónica)
40. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, DiGiuseppe PA, et al. Type VII secretion—mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology*. 2007; 5(11): 883-891 pp.
41. Serafini A, Boldrin F, Palù G, and Manganelli R. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. *Journal of Bacteriology*. 2009; 191 (20): 6340-6344.
42. Siegrist MS, Unnikrishnan M, McConnell MJ et al. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106 (44): 18792- 18797 pp.
43. Hermans PWM, Van Soolingen D and Van Embden JDA. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *J. Bacteriol*. 1992; 174: 4157–4165 pp.
44. Camus JC, Pryor MJ, Médigue C and Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*. 2002; 148 (10): 2967-2973 pp.

45. Gey Van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, and Warren RM. Evolution and expansion of the Mycobacterium tuberculosis PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions [en línea]. BMC Evolutionary Biology. 2006 [citado: 22 junio]; 6: (Versión electrónica). Disponible en: <https://bmcecol.evol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1471-2148-6-95.pdf>
46. Zheng CJ, Sohn MJ and Kim WG. Atromentin and leucomelone, the first inhibitors specific to enoyl-ACP reductase (FabK) of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Antibiotics. 2006; 59 (12): 808-812 pp.
47. Zhang Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2005; 45: 529-564 pp.
48. Zhang N, Torrelles JB, McNeil MR et al. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. Molecular Microbiology. 2003; 50 (1): 69-76 pp.
49. Telenti A, Lowrie D, Matter L et al. Detection of rifampicin-resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. The Lancet. 1993; 24(8846): 647-650 pp.
50. Somoskovi A, Parsons LM, and Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Respiratory Research. 2001; 2 (3): 164-168 pp.
51. Nolte, F.S. y Metchock B. Mycobacterium in: Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. ASM. Press, Washington D.C. 1995. pp. 400-37 pp.
52. Caminero JA, et al. Tratamiento de la tuberculosis. Paris: UICTER, 2002. 1250- 1258 pp.
53. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de técnicas y procedimientos de bacteriología de la tuberculosis. 2ed. Guatemala. 2001.
54. Zuñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodríguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. [en línea] 2012. Marzo [citada: 22 junio 2021]; Article

ID 193923: 18 pp.

Disponible en: <https://downloads.hindawi.com/journals/jir/2012/193923.pdf>

55. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004; 120:213-32 pp.
56. Baron JM, Dickel H, Jacobs S, Schiffer R, Merk HF, Büdinger L. Detection of a TH1like cytokine expression pattern in lesional skin of a patient with cutaneous tuberculosis. *Arch Dermatol Res.* 2001; 293:373-6 pp.
57. Fukamachi S, Kawakami C, Kabashima R, Sawada Y, Sugita K, Nakamura M, et al. Tuberculosis verrucosa cutis with elevation of circulating T-helper 1 and 17 cells and their reductions after successful treatment. *J Dermatol.* 2012; 39:507-9 pp.
58. MINSA, Análisis de la situación de salud en el Perú 2019. Informe del MINSA. Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis/Asis\\_peru19.pdf](https://www.dge.gob.pe/portal/docs/asis/Asis_peru19.pdf) (2019).
59. Brack A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Edit. PNUD, Cuzco 1999.
60. Cruz-Vega DE, Verde-Star MJ, Salinas-González N, Rosales-Hernández B, Estrada-García I, Mendez-Aragón P, Carranza-Rosales P, González-Garza MT, Castro-Garza J. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytother Res.* 2008; 22(4):557-9.
61. Lall N, Meyer JJ. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol.* 1999; 66(3):347-54.
62. Kirimuhuzya C, Waako P, Joloba M, Odyek O. The anti-mycobacterial activity of *Lantana camara* a plant traditionally used to treat symptoms of tuberculosis in South-western Uganda. *Afr Health Sci.* 2009; 9(1):40-5.
63. Rojas R, Caviedes L, Lock O, Gilman R. Anti-mycobacterium tuberculosis activity of Peruvian plant extracts using rapid, inexpensive colorimetric assay. *Recent progress in Medicinal Plants.* Vol. 12, Studium Press, LLC, Houston. 2006. pp.429-441.

64. Tereschuk, M.L., De Figueroa, L.I., Abdala, L.R. Flavonoids with antimicrobial activity from argentine species of Tagetes. Health microbiology protocols J.F. Spencer and A.L. Ragout de Spencer (eds). In press. Tolowa, Canadá. 2002.
65. Martínez-Flórez, J., González-gallego, J.M., Tuñón, M.J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr Hosp. 2002; 17:271-278.
66. Fuertes C, Roque M y Tristan M. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* C.P.Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigacion. 1998; 1 (2): (Versión electrónica).
67. Paris, M. et M. Hurabielle-Abrégé de Matière Médicale - Pharmacognosie, tomo 1, y tomo 2. Ed. Masson. París, 1981.
68. Evans, W.C. -Trease and Evans -Pharmacognosy-, 15TH ed. Ed. Saunders, Edinburgh, 2000.
69. Phongpaichit S., Vuddhakul V., Subhadhirasakul S., Wattanapiromsakul C. Evaluation of the Antimycobacterial Activity of Extracts from Plants Used as Self-Medication by AIDS Patients in Thailand. Pharmaceutical Biology. 2006; 44: 71-75.
70. Camacho M., Favela J., Gonzalez O., Garza E., Molina G., Said S., Delgado G., Luna J. Evaluation of some plant-derived Secondary metabolites against sensitive and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J. Mex. Chem. Soc. 2009; 53(2): 71-75.
71. Rogoza L., Salakhutdinov N., Tolstikov G. Antituberculosis Activity of natural and synthetic compounds. Chemical for sustainable development. 2010; 18: 343-375.
72. Collins L, Franzblau SG. Microplate Alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compound against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agents Chemother. 1997; 41 (5):1004-9.
73. Inderlier, C.B., Nash, K.A. Antimycobacterial Agents; in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids. In: Antibiotics in Laboratory Medicine. 4th ed.

- Ed: Lorian, V., Williams and Wilkins, Baltimore. 1996. pp. 127-75.
74. Shawar RM, Humble DJ, Van Dalfsen JM, Stover CK, Hickey MJ, Steele S, Mitscher LA, Baker W. Rapid Screening of Natural Products for Antimycobacterial Activity by Using Luciferase-Expressing Strains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1997; 41 (3): 570-4
75. Cooksey RC, Crawford JT, Jacobs WR y TM Shinnick. A rapid method from screening antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(6):1348-52.
76. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, Torres P, Madico G, Hernandez A, Degnan MT, Cook MB, Quenzer VK, Ferguson RM, Gilman RH. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J Clin Microbiol.* 1998; 6 (2): 362-6.
77. Foongladda S, Roengsanthia D, Arjattanakool W, Chuchottaworn C, Chaiprasert A, Franzblau SG. Rapid and simple MTT method for rifampicin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobactenum tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6 (12):1118-22.
78. Morcillo N, Di Giulio B, Testani B, Pontine M, Chirico C, Dolmann A. A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004; 8 (2):253-9.
79. Gibbons S, Fallah F, CW Wright. *Cryptolepine hydrochloride*: a potent antimycobacterial alkaloid derived from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Phytother Res.* 2003; 17 (4): 434-6.
80. Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate. *J Antimicrob Agent Chemother* 2002, 46: 2720-2.
81. Martin A, Camacho M, Portaels F, Palomino JC. Resazurin microtiter assay plate of *Mycobacterium* susceptibilities to second line drugs: rapid, simple and

- inexpensive method. *J Antimicrobial Agent Chemother* 2003, 47: 3616-9 pp.
82. Palomino JC. Newer diagnostics for tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12: 172-8.
83. Rasmussen EV. Use of fluorescent redox indicators to evaluate cell proliferation and viability. *In Vitro Mol Toxicol* 1999; 12:47-58.
84. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000, 267: 5421-6.
85. 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>
86. Duke JA, Vasquez R. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. CRC Press; 1994. 224 p.
87. Brako L, Zarucchi JL. *Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú*. Missouri Botanical Garden; 1993. 1336 p.
88. Kidd SB. A note on *Piper aduncum* in Morobe Province, Papua New Guinea. *Sc N Guinea*. 1997; 22:121-123 pp.
89. 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.
90. 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.
91. Quezada JA. Aislamiento, caracterización y actividad antifúngica de metabolitos secundarios a partir de *Piper carpunya* Ruiz & Pav. [Ecuador]: Universidad Técnica Particular de Loja; 2012.
92. Tebbs, M.C. Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World. The taxonomy of *Piper* section *Churumayu*. 1990;20(2):193-236.
93. 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.
94. Ruiz Quiroz JR. Actividad Antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de 8 plantas medicinales [Tesis]. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima, 2013.
  95. Acosta S, Leon C, Leal A. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica colorimétrica de azul de alamar. Infectio 2004, 8 (3): 194-202pp.
  96. Chauca JA, Palomino JC, Guerra H. Evaluation of the accuracy of the microplate Alamar Blue assay for rapid detection of MDR-TB in Peru. Int J Tuberc Lung Dis. 11(7): 820-822pp
  97. Instituto Nacional de Salud. Susceptibilidad a drogas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante observación microscópica (MODS). Lima, 2011.
  98. Liu M, Seidel V, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. Methods. 2007; 42: 325-329pp.
  99. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. 2008; 3(2):163-175pp.
  100. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV and Filho BP Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(7):1027-1031pp.
  101. Análisis de la situación de salud del Perú 2015, [en línea]. Ministerio de Salud, Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades; 2015. Disponible en:  
<https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/publicaciones/analisis-de-situacion-de-salud-asis/>
  102. Chase, M.W. and Reveal, J.L. (2009) A Phylogenetic Classification of the Land Plants to Accompany APG III. Botanical Journal of the Linnean Society,

- 161, 122-127.
103. Mejia, K. & Renfijo, E. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. Segunda. Lima: Agencia Española de cooperación internacional (AECI) y el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), 2000.
  104. Tebbs, M. Revision of Piper(Piperaceae) in the New World 3. Londres: Biodiversity Heritage Library, 1993. ISBN 0153121000203. Disponible en: [www.biodiversitylibrary.org/part/98680](http://www.biodiversitylibrary.org/part/98680)
  105. Delgado, G., Kato, M. & Rojas, C. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos in vitro de Piper sp. A: Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 2013, Vol. 12, núm. 3, p. 269-282. ISSN 07177917. Disponible en: [www.redalyc.org/articulo.oa?id=85626383012](http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85626383012)
  106. Gustafson, K.R. et al. The Peltatols, Novel HIV-Inhibitory Catechol Derivatives. A: J. Org. Chem. 1992, Vol. 57, núm. 6, p. 2809-2811. Disponible en: [pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00036a010](http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00036a010)
  107. Mongellil, E. et al. Cytotoxic 4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe peltata Inhibits Topoisomerase I Activity. A: Planta Med. 1999, Vol. 65, p. 376-378. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364848>
  108. Nuñez, V. et al. Inhibitory effects of Piper umbellatum and Piper peltatum extracts towards myotoxic phospholipases A 2 from Bothrops snake venoms : Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. A: PHYTOCHEMISTRY. 2005, Vol. 66, p. 1017-1025. DOI 10.1016/j.phytochem.2005.03.026. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896371>
  109. Pino, N. Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género Piper L. (PIPERACEA). A: Revista Institucional Universidad Tecnológica del Choco: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo [en línea]. 2008, Vol. 27, núm. 1, p. 67-75. Disponible en: [//dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2705040](http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2705040)
  110. Salamanca S. y Galiano M. Actividad antimicrobiana de cuatro especies del género Piper y elucidación estructural de sus aceites esenciales. [Tesis para

optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: UNMSM; 2016

Disponible

en:

[https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/5967/Salamanca\\_rs.pdf?sequence=3](https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/5967/Salamanca_rs.pdf?sequence=3)

111. 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>
112. Rivoire N, Ravololonandriana P, Rasolonavalona T, Martin A, Portaels F, Ramarokoto H, Rasolofo Razanamparany V. Evaluation of the resazurin assay for the detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 Jun;11(6):683-8. PMID: 17519102.
113. Phongpaichit, S., Vuddhakul, V., Subhadhirasakul, S., & Wattanapiromsakul, C. J. P. B. (2006). Evaluation of the antimycobacterial activity of extracts from plants used as self-medication by AIDS patients in Thailand. *Pharmaceutical biology*, 44(1), 71-75.
114. Laurentiz, R. S., Borges, A., Laurentiz, A. C., Silva, M. L. A., & Martins, C. H. G. (2015). Avaliação da atividade antimicobacteriana da lignana diidroscubebina extraída da *Piper cubeba* e de seus derivados semissintéticos. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 17, 782-789.
115. Gonzales, K., Salazar, M. E., & Fuertes, C. M. (2022). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* Griseb." Muña" y *Piper carpubya* Ruíz & Pav." Pinku". *Ciencia e Investigación*, 24(2), 21-26.
116. Sauñe, A. y Reynel, C. Las especies de *Piper* ("Matico") del valle de Chanchamayo (Dp. Junín). Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional Agraria-La Molina / Centro de Estudios en Dendrología de la Fundación para el Desarrollo Agrario y Asociación peruana para la Promoción del Desarrollo Sostenible. 72 pp.
117. Stephens CH., Tanious F., Kim S., Wilson W. D., Schell W., Perfect J.,

- Franzblau S. y Boykin D. Diguanidino and reversed diamidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* 44, 1741-1748. (2001)
118. Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB and Neto CC. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *J Ethnopharmacol.* 2004; 94(2-3):279-281.
119. Sarker SD, Nahar L and Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007; 42(4):321-324.
120. Escobar, L., Rivera, A., y Aristizabal, F. A. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae*, 17(1), 67-74.
121. Van A, Joubert A, Cromarty A. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 - diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8: 47.
122. Montelongo-Peralta, L. (2018). Uso de metales de transición en ensayos contra *Mycobacterium tuberculosis* multifarmacorresistente. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina (ISSN: 2448-8380)*, 27-27.

# ANEXOS

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
Email: [jocamde@gmail.com](mailto:jocamde@gmail.com)  
Cel: 963689079



## CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 – INSCRITO 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.

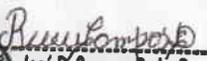
Que, **ALEXIS GONZALO AIRE**, con grado académico de Bachiller, egresado de la Universidad Alas Peruanas. Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar su proyecto de tesis y optar el título de Químico Farmacéutico, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente de la localidad de Pedro Ruíz, distrito de Jazán, provincia de Bongará, departamento de Amazonas, donde es conocida con el nombre vulgar de “**matico negro**”, la muestra ha sido, identificada como *Piper amalago* L. Según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), el sistema APG, evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden y según Mark W. Chase & James L. Reveal (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida, la especie estudiada ocupa la siguiente posesión taxonómica:

Reino: Plantae  
Clase: Equisetopsida  
Subclase: Magnoliidae  
Superorden: Magnolianaes  
Orden: Piperales  
Familia: Piperaceae  
Género: *Piper*  
Especie: *Piper amalago* L.

Nombre vulgar: “matico negro”

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 05 de abril del 2022

  
José R. Campos De La Cruz  
BIÓLOGO  
C.B.P. 3796

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
Email: [jocamde@gmail.com](mailto:jocamde@gmail.com)  
Cel: 963689079



## CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 - INSCRITO 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, **ALEXIS GONZALO AIRE**, con grado académico de Bachiller, egresado de la Universidad Alas Peruanas. Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar su proyecto de tesis y optar el título de Químico Farmacéutico, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente de la comunidad nativa de Yamayakat, distrito de Imaza, provincia de Condorcanqui, departamento de Amazonas, donde es conocida con el nombre vulgar de “**santa maría**”, la muestra ha sido, identificada como *Piper peltatum* L. Según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), el sistema APG, evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden y según Mark W. Chase & James L. Reveal (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida, la especie estudiada ocupa la siguiente posesión taxonómica:

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Magnolianae

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

Especie: *Piper peltatum* L.

Nombre vulgare: “santa maría”

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 05 de abril del 2022



*José R. Campos De La Cruz*  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
Email: [jocamde@gmail.com](mailto:jocamde@gmail.com)  
Cel: 963689079



## CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 – INSCRITO 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, **ALEXIS GONZALO AIRE**, con grado académico de Bachiller, egresado de la Universidad Alas Peruanas. Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar su proyecto de tesis y optar el título de Químico Farmacéutico, ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente de la localidad las Naranjas, distrito de Jaén, provincia de Jaén, departamento de Cajamarca, donde es conocida con el nombre vulgar de “**carpunya**”, la muestra ha sido, identificada como ***Piper carpunya Ruiz & Pav.*** Según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), el sistema APG, evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden y según Mark W. Chase & James L. Reveal (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida, la especie estudiada ocupa la siguiente posesión taxonómica:

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Magnolianae

Orden: Piperales

Familia: Piperaceae

Género: *Piper*

Especie: *Piper carpunya* Ruiz & Pav.

Nombres vulgares: “carpunya”, “carpundia”, “tilonga”

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 05 de abril del 2022



*José R. Campos De La Cruz*  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796

## ANEXO 4: MATRIZ DE CONSISTENCIA

**Título: BIOACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE LAS ESPECIES *Piper carpunya* R&P.(Carpunya), *Piper peltatum* L. (Santa María) y *Piper amalago* L. (Matico negro) FRENTE A *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37RV, MEDIANTE EL ENSAYO EN MICROPLACAS CON RESAZURINA**

PROBLEMAS DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
<p><b>Problema general</b></p> <p>¿Presentarán bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y <i>Piper amalago</i> (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con rezasurina?</p>	<p><b>Objetivo General</b></p> <p>Determinar la bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV de los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y <i>Piper amalago</i> (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con rezasurina.</p>	<p><b>Hipótesis General</b></p> <p>Los extractos etanólicos y clorofórmicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (Carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y <i>Piper amalago</i> (matico negro), presentan bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV, mediante el ensayo en microplacas con rezasurina.</p>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>Experimental Transversal Prospectivo</p>	<p><b>Método de investigación</b></p> <p>Deductivo</p>	<p><b>Variable Independiente (x)</b></p> <p><b>x:</b> Extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (Carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (Santa maría) y <i>Piper amalago</i> (Matico negro) <b>Indicadores:</b> <b>x1:</b> Concentraciones de los extractos: (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63 µg/ml)</p>	<p><b>Población</b></p> <p><i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y <i>Piper amalago</i> L. (matico negro)</p>

Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Especificas	Nivel de Investigación:	Diseño de investigación	Variable dependiente (y)	Muestra
<p>¿Presentarán bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, los extractos etanólicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina?</p>	<p>Determinar la bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV de los extractos etanólicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina.</p>	<p>Los extractos etanólicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro), presentan bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, mediante el ensayo en microplacas con resazurina.</p>	<p>Explicativo</p>	<p>Experimental</p>	<p>y: Bioactividad sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv</p>	<p>Extracto etanólico y clorofórmico de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro).</p>
<p>¿Presentarán bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, los extractos clorofórmicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina?</p>	<p>Determinar la bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV de los extractos clorofórmicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro), mediante el ensayo en microplacas con resazurina.</p>	<p>Los extractos clorofórmicos de las hojas de las especies <i>Piper carpunya</i> R&amp;P. (carpunya), <i>Piper peltatum</i> L. (santa maría) y Piper amalago (matico negro), presentan bioactividad significativa sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, mediante el ensayo en microplacas con resazurina.</p>				