

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, a figure holding a book, and two lions. The shield is flanked by two towers. The Latin motto "CETERA ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Fraccionamiento Bioguiado de Cuatro Especies Nativas del
Género *Piper* con actividad demostrada en modelos *in vitro***

Andrea Cristina Ovalle Morales

Eva María Palacios Castañeda

Keila Noemí Abdalla Mansilla

Lesly Sarai Juárez García

QUÍMICAS BIÓLOGAS

Guatemala, noviembre de 2012

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Fraccionamiento Bioguiado de Cuatro Especies Nativas del
Género *Piper* con actividad demostrada en modelos *in vitro***

Seminario de Investigación

Presentado por

Andrea Cristina Ovalle Morales

Eva María Palacios Castañeda

Keila Noemí Abdalla Mansilla

Lesly Sarai Juárez García

Para optar al título de

Químicas Biólogas

Guatemala, noviembre de 2012

ÍNDICE

TEMA	PÁGINA
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Ámbito de la Investigación	4
4. Antecedentes	5
4.1 Familia <i>Piperaceae</i>	5
4.2 Género <i>Piper</i>	5
4.3 Usos populares	6
4.4 Estudios en Guatemala	6
4.5 Descripción de las especies seleccionadas	7
4.6 Partición líquido-líquido	14
4.7 Demostración de la actividad antioxidante y biocida <i>in vitro</i>	15
5. Justificación	19
6. Objetivos	20
7. Hipótesis	21
8. Materiales y Métodos	22
8.1 Universo de trabajo	22
8.2 Recursos	22
8.3 Procedimiento	27
8.4 Diseño de la investigación	41
8.5 Análisis estadístico	41
9. Resultados	43
9.1 Preparación de extractos	43
9.2 Actividad antioxidante	43
9.3 Actividad antimicrobiana	48
9.4 Actividad antifúngica	53
9.5 Actividad larvicida	55
10. Discusión de Resultados	57
11. Conclusiones	63
12. Recomendaciones	64
13. Referencias Bibliográficas	65
14. Anexos	72

DEDICATORIAS

A Dios

Por la vida, por todas las bendiciones recibidas, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad, permitiendo que nuestro anhelo sea hoy una realidad.

A nuestros padres

Pilares de nuestras vidas, que día a día velaron por la realización de este sueño, sin su apoyo, nada de esto sería posible.

A nuestros hermanos

Por estar siempre a nuestro lado, por las alegrías y tristezas que hemos compartido, por el amor, apoyo y amistad pura.

A nuestras familias

Por su apoyo y sus palabras de aliento en los momentos necesarios.

A nuestros amigos

Por los momentos vividos, porque siempre ocuparán un lugar en nuestro corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

Nuestra *alma mater*, centro que nos acogió durante nuestros años de estudio e inculcó en nosotras la responsabilidad, el trabajo y la dedicación.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Porque en sus aulas, aprendimos elementos científicos y éticos que nos permitirán desarrollarnos como excelentes profesionales. Y porque en ella, encontramos el amor a nuestra carrera y el verdadero significado de la amistad.

Al Departamento de Citohistología y al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales –LIPRONAT-

Por la enseñanza y el espacio brindado para poder llevar a cabo la fase experimental de la presente investigación.

Al Licenciado Armando Cáceres

Por su apoyo y cariño incondicional, porque más que un asesor, es un amigo.

A la Licenciada Isabel Gaitán

Por su valiosa ayuda, orientación y apoyo en la realización de la presente investigación.

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

1. RESUMEN

En el presente estudio se seleccionaron cuatro especies del género *Piper* (*P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*), con el fin de evaluar la actividad antioxidante y biocida (antimicrobiana, antifúngica y larvicida) de los extractos etanólicos y sus respectivas particiones líquido-líquido.

El extracto etanólico se preparó por percolación con etanol y se concentró utilizando rotavapor; a partir de éste, se realizó partición líquido-líquido utilizando disolventes con diferente gradiente de polaridad (hexano, acetato de etilo y etanol). Las particiones permiten obtener extractos que faciliten la identificación de los metabolitos secundarios responsables de la actividad.

El mayor rendimiento de los extractos en etanol se obtuvo en *P. auritum* (44.60%) y en las particiones con acetato de etilo (35.40%) de la misma especie.

La actividad antioxidante cualitativa fue evaluada con la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) con DPPH; y por espectrofotometría UV-Vis los métodos cuantitativos de fenoles totales, DPPH y ABTS. El extracto etanólico de *P. patulum* fue quien presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos (107.06 ± 1.04 μg equivalente de ácido gálico/mg) y la mejor actividad antioxidante cuantitativa para los métodos de DPPH y ABTS (CI_{50} 1.56 ± 0.0332 mg/mL y CI_{50} 1.98 ± 0.06 mg/mL).

Se determinó la actividad antimicrobiana (bacterias y levaduras) de los extractos y sus particiones mediante el método de dilución en agar, evidenciando actividad significativa ($p=0.0625$) para las cuatro especies de *Piper* contra bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*), bacterias gram negativas (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*), levaduras (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) y micobacterias (*Mycobacterium smegmatis*), dicha actividad fue reportada como concentración inhibitoria mínima (CIM). El extracto etanólico con mejor actividad antibacteriana fue *P. patulum* contra *B. subtilis* (CIM 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la partición en hexano (CIM 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En las particiones, los mejores resultados se obtuvieron con la partición hexánica de *P. patulum* (CIM 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), partición en acetato de etilo de *P. jacquemontianum* (CIM 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$) contra *M.*

smegmatis. Y en la actividad anti levadura, la partición hexánica de *P. patulum* (CIM 15.63 µg/ml) contra *C. neoformans*.

La actividad antifúngica evidenció actividad significativa ($p=0.0625$) del extracto etanólico y las particiones de *P. jacquemontianum* contra los dermatofitos *Microsporum gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*.

En la evaluación de la actividad larvicida se determinó que la actividad contra larvas de *Anopheles albimanus* y *Stegomyia aegypti*, se encontró en las particiones en hexano de las cuatro especies, dicha actividad fue reportada como concentración letal 50 (CL₅₀). Con respecto a *S. aegypti* se encontró la mejor actividad en la partición en hexano de *P. patulum* para los cuatro estadios; estadio 1 (CL₅₀ 0.28 mg/mL), estadio 2 (CL₅₀ 0.59 mg/mL), estadio 3 (CL₅₀ 0.29 mg/mL), estadio 4 (CL₅₀ 0.53 mg/mL). Para *A. albimanus* la mejor actividad se encontró en la partición en hexano de *P. auritum* para los cuatro estadios; estadio 1 (CL₅₀ 0.25 mg/mL), estadio 2 (CL₅₀ 0.15 mg/mL), estadio 3 (CL₅₀ 0.48 mg/mL), estadio 4 (CL₅₀ 0.42 mg/mL).

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace miles de años. La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia, a pesar de la amplia variedad de medicamentos de síntesis química existente, ya que las plantas medicinales ofrecen la ventaja de causar menos efectos secundarios, comparado con los medicamentos de síntesis, además, presentan mayor disponibilidad para la población. Esta situación exige que se profundice en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extrae.

Dentro de la flora guatemalteca existe una gran variedad de especies vegetales con propiedades aromáticas y medicinales, como es el caso de la familia de piperáceas, a las cuales se les atribuyen propiedades analgésicas, antipiréticas y descongestionantes.

La presente investigación se realizó con el objetivo de validar de forma científica las propiedades que se les atribuye popularmente a cuatro especies nativas del género *Piper*: *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*; éstas fueron recolectadas en la ecoparcela “El Kakawatal” ubicada en Samayac, Suchitepéquez. Las especies fueron sometidas a bioensayos para evaluar la actividad biocida (antimicrobiana, antifúngica y larvicida) y actividad antioxidante de los extractos etanólicos y sus particiones respectivas con hexano, acetato de etilo y etanol. La finalidad del presente estudio es contribuir al aprovechamiento de los recursos naturales de Guatemala. La continuidad al mismo permitirá que estas plantas puedan ser validadas y utilizadas en nuevos productos medicinales y/o productos aromáticos.

3. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En el proyecto FODECYT 19-2009 se estudió la actividad biológica de 11 especies del género *Piper* nativas de Mesoamérica, de las cuales, cuatro (*P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron*, *P. patulum*) poseen actividad antioxidante y bactericida contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella gallinarum*, *Bacillus subtilis* (Cruz, et al., 2005c ; Véliz, et al., 2006).

Durante el desarrollo de la presente investigación, se contó con el equipo, procedimiento y apoyo profesional del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) y el Laboratorio de Bioensayos del departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; al efectuar el fraccionamiento fitoquímico de los extractos, dicha técnica facilitó la separación de porciones medicinales activas provenientes de tejido vegetal, de todos aquellos componentes inactivos o inertes mediante el uso de solventes selectivos y de diferente polaridad. Posteriormente, se realizó bioensayos de los extractos obtenidos, para el análisis de actividad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica y larvicida; con el apoyo, material y equipo de la Unidad de Bioensayos de Citohistología.

4. ANTECEDENTES

4.1 Familia *Piperaceae*

La familia *Piperaceae* comprende 10 géneros y aproximadamente 1,400 a 2,000 especies de *Piper*, distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales del planeta (Standley, & Steyermark, 1952). Otros autores aceptan sólo cuatro géneros, por las diferencias en la inflorescencia, reduciendo a 700 las especies de *Piper*. Las especies pertenecientes a la familia *Piperaceae* frecuentemente son arbustos aromáticos, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Sus hojas son alternas, enteras, a menudo lobuladas en la base, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta. Inflorescencias terminales, opuestas y solitarias, raramente axilares y en grupo sobre un eje común ramificado simulando umbelas o panículas, las flores forman bandas alrededor de la espiga; el fruto al madurar es ligeramente distorsionado por compresión de los frutos adyacentes (Torres, & García, 2001).

4.2 Género *Piper*

El género *Piper* se caracteriza por ser arbustos o árboles más o menos leñosos, a veces con madera blanda y sub-herbácea, ocasionalmente trepadora, tallos usualmente con nudos engrosados, hojas enteras, simples alternas o lobuladas, nudosidades e inflorescencia en aumento (Benítez, 2008). El género *Piper* está ampliamente distribuido en el trópico, contiene más de mil especies (García, Leyva, Martínez, & Stashenko, 2007).

En Guatemala, están descritas aproximadamente 88 especies de *Piper*, la Flora de Guatemala informa de 11 especies distribuidas en 7-9 departamentos, 24 con una distribución media en 2-9 departamentos y 53 con una distribución escasa. (Standley, & Steyermark, 1952).

Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuyen propiedades analgésicas, antirreumáticas, diuréticas, estimulantes, digestivas, antiulcerosas, dermatológicas, antidiarreicas, antihelmínticas y bactericidas (Cleaves, 2001; Orjala, Wright, Rali, & Sticher, 1993; Sáez, et al., 1998). Este género tiene además una composición química que incluye fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, sesquiterpenos y

monoterpenos como borneol, alcanfor, cineol, eugenol, safrol y una amplia variedad de componentes bencénicos (García, et al., 2007), también han sido aislados metabolitos secundarios como alcaloides, chalconas, kawapironas, flavonas, aceites esenciales, amidas y alcanidas entre otros (Soberón, Rojas, Saavedra, Kato, & Delgado, 2006; Torres, & García, 2001).

4.3 Usos populares

En las regiones tropicales de México se consume la hoja santa o acuyo (*Piper auritum*) por el aroma anisado y el sabor picante de sus hojas. *P. amalago* se exporta de México a Brasil y se utiliza para aliviar el dolor de pecho y como agente antiinflamatorio (Rojas, 2009). En Polinesia, en forma de bebida ritual, se consume tradicionalmente la planta denominada Kava-kava (*Piper methysticum* Forst). La bebida se obtiene al premasticar la raíz y dejar fermentar el producto; se utiliza en ceremonias religiosas de las comunidades de estas islas. Se argumenta que su consumo reduce la tensión emocional y actúa en forma similar al Valium sin privar al consumidor del estado de alerta (Torres, & García, 2001). La pimienta negra, es la pequeña baya del fruto de *Piper nigrum* L., es la especie más usada como condimento en la preparación de carnes y como preservante en la preparación de embutidos; además de sus numerosas aplicaciones culinarias, también se utiliza en la medicina (Benítez, López, & Romero, 2002).

4.4 Estudios en Guatemala

En Guatemala se han descrito aproximadamente 88 especies de *Piper* distribuidas en diferentes regiones del país, de las cuales se encuentra muy poca información química y farmacológica (Cáceres, 1996).

En 2005 se realizó un estudio en el cual se identificaron cinco especies del género *Piper*, de las cuales cuatro son nativas de Guatemala y se distribuyen principalmente en Mesoamérica, dentro de éstas se mencionan: *P. jacquemontianum*, *P. hispidum*, *P. patulum*, *P. auritum* y *P. aduncum* con una distribución más amplia. De la extracción del aceite esencial y determinación de rendimiento se obtuvo como resultado que la especie que presenta mayor rendimiento es *P. auritum* (2.0%) seguida de *P. aduncum* (1.64%), *P.*

hispidum (0.46%), *P. patulum* (0.45%) y la de menor rendimiento es *P. jacquemontianum* (0.3%). En estas especies de *Piper* se identificaron monoterpenos como componente mayoritario. Mediante el tamizaje fitoquímico se identificaron flavonoides, saponinas, principios amargos, alcaloides y aceite esencial en todas las especies, cumarinas únicamente en *P. auritum* y antraquinonas en muy poca cantidad en *P. auritum*, *P. aduncum*, *P. aeruginosibaccum* y *P. hispidum*. La evaluación de la actividad biológica se realizó mediante el método de dilución y el método de difusión en disco, el cual resultó más efectivo en el caso de aceites esenciales. Se evaluó la actividad de los aceites esenciales contra bacterias y levaduras presentando actividad contra *Mycobacterium smegmatis* y *B. subtilis* a una concentración menor de 0.1 mg/mL, siendo *P. aeruginosibaccum* la que presenta mayor actividad. La evaluación contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *E. coli* no presentó crecimiento. Los aceites esenciales de *Piper* también presentaron actividad contra *Anopheles albimanus* y *Stegomyia aegypti*) a una concentración menor de 0.5 mg/mL (Cruz, et al., 2005a).

En el año 2008 se realizó una caracterización de extractos y aceites esenciales, y evaluación de la actividad biológica de hoja de *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum* en donde todas las muestras presentaron alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas y taninos, éstos últimos, fueron presentados únicamente por la especie *P. jacquemontianum*, procedente de la Laguna de Lachuá. Los extractos de *P. umbellatum* (diclorometánico) y *P. jacquemontianum* (diclorometánico y metanólico) presentaron actividad significativa ($p < 0.10$) contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*; el extracto de *P. jacquemontianum* (diclorometánico) presentó una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de 0.5 mg/mL contra *B. subtilis* y *M. smegmatis* (Gómez, 2008).

4.5 Descripción de las especies seleccionadas

4.5.1 Nombre Científico

Piper auritum Kunth.

4.5.1.1 Sinonimias

Artanthe aurita (Kunth) Miq.; *A. caladiifolia* Miq.; *A. seemanniana* Miq.; *A. sanctum* Miq.; *Piper alstonii* Trel.; *P. auritilaminum* Trel.; *P. auritulimbun* Trel.; *P. heraldi* var. *concleanum* Trel.; *P. perlongipes* Trel.; *P. sanctum* (Miq.); *Schilleria aurita* (Kunth) Kunth (Duke, Bogenschutz-Godwin, & Ottesen, 2008; Gupta, 2008; Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.1.2 Nombres comunes

Cordoncillo, hoja de jute, juniapra, caña de oro (Guatemala), anisillo, hoja de la estrella, juniapa, koloko (Costa Rica), Santa María (Costa Rica, Honduras), acoyo, acullo cimarrón, hoja santa, yerba santa (México), xaclipur, xcakulam, xmacolan (Maya) (Duke, Bogenschutz-Godwin, & Ottesen 2008; Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.1.3 Descripción botánica

Arbusto o árbol delgado, más o menos de 6 m de altura. Hojas con peciolo de 4-10 cm de largo, aromáticos, alternas, lámina de 20-25 cm de largo, 12-30 cm de ancho, ovalada a elíptica, muy desigual de la base. Inflorescencia libre de la base de la hoja, pedúnculo de 4-10 cm de largo, con bráctea floral redonda a triangular con un borde conspicuo de pelos blancuzcos. Fruto piramidal, alrededor de 0.5-0.8 mm de largo. Se reconoce fácilmente por las hojas delgadas y forma poco común con margen denso de pelos cortos a lo largo del borde y el olor parecido a la zarzaparrilla (*Smilax*) cuando se estruja (Gupta, 2008; Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.1.4 Distribución geográfica y hábitat

Se distribuye ampliamente desde México, Centroamérica, Colombia y algunas de las islas del Caribe. Especie común en bordes de bosque y en sitios abiertos, matorrales, de 0-1200 msnm. En Guatemala se puede encontrar en Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango y San Marcos (Gupta, 2008; House, et al., 1995; Morton, 1981; Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.1.5 Usos etnomédicos y modo de empleo

En Guatemala se hace referencia al uso de la hoja en decocción y por vía oral, contra diversas afecciones: fiebre, hematoma, dolor de cabeza (Standley, & Steyemark, 1952). En Costa Rica se emplean las hojas frescas en forma tópica, en diversas afecciones, tales como: la sarna, dolor de cabeza, dolor abdominal y del corazón (Burger, 1971). En Honduras se reportó el uso para combatir el dolor de muela, la debilidad, las inflamaciones, la calentura y las hemorragias por heridas; contra la sarna se emplean las hojas y la raíz, en forma de baño; para el dolor de cabeza, se colocan las hojas sobre la cabeza y para el dolor de muela se hacen enjuagues del cocimiento de la hoja (House, et al., 1995). En Nicaragua, las hojas en infusión, por vía oral, se emplean en diversas enfermedades: anemia, fiebre, corazón, riñones e hígado (Stevens, Ulloa, Pool, & Montiel, 2001). En México las hojas frescas en infusión se usan como emenagogo vía oral (Rojas, 2009). En Panamá, las hojas y los tallos secos se emplean contra la gripe y como emenagogo (Duke, Bogenschutz-Godwin, & Ottesen, 2008).

4.5.1.6 Actividad farmacológica y biológica

Se reporta la actividad antifúngica contra *Cladosporidium cucumerinum*, así mismo, se reporta actividad antibacteriana del extracto acetónico de las ramas secas, contra *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. gallinarum*, *Sarcina lutea* y *Staphylococcus aureus*. El extracto acuoso mostró actividad antibacteriana contra: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Shigella flexneri*. Estudios farmacológicos demuestran que el extracto de hoja y tallo tiene efecto espasmogénico en íleon de cobayo. También se ha demostrado un efecto estimulante sobre el útero de rata y efecto citotóxico. Estos dos efectos sugieren posibilidades de toxicidad y se debe tener cuidado con su uso (García, et al., 2007; Duke, et al., 2008).

4.5.1.7 Composición Química

El aceite esencial de las hojas de *P. auritum* contiene varios terpenoides (mono-, sesqui- y diterpenos), tales como limoneno, linalool, mirceno, canfeno, alcanfor, *p*-cemen-

8-ol, *p*-sabineno, entre otros, y algunos flavonoides y fenilpropanoides. Estudio de tamizaje preliminar muestra la presencia de alcaloides (García, et al., 2007).

4.5.2 Nombre Científico

Piper jacquemontianum Kunth.

4.5.2.1 Sinonimias

P. aeruginosibaccum Trel.; *P. citrifolium* var. *Cookii*; *P. onerosum* Trel.; *P. praeterlatum* Trel.; *P. dimorphophyllum* Trel. & Standl.; *P. gentlei* Trel.; *P. nitidulifolium* Trel. & Standl.; *P. kantelulense* Trel. & Standl.; *P. kantelulense* var. *gentlei* Trel. & Standl.; *P. discolor* Trel. & Standl.; *P. emancipationis* Trel. & Standl.; *P. emancipationis* var. *longum* Trel. & Standl.; *P. nitidulilaminum* Trel. & Standl.; *P. plumbeicolor* Trel. & Standl.; *P. subcitrifolium* C. DC.; *P. jactatum* Trel.; *Cordoncillo poozcuyaax* (Burger, 1971; Gupta, 2008; Standley, & Steyermark, 1952; Stevens, et al., 2001; Tebbs, 1993).

4.5.2.2 Nombres Comunes

Cordoncillo, poozcuyaax (Gupta, 2008).

4.5.2.3 Descripción botánica

Arbustos de 2-3 m de alto, de ramas jóvenes de color marrón, hojas de 10-22 cm de largo y de 2-5 cm de ancho, angostamente lanceoladas o elíptico-ovaladas, brillante en la parte superior, ápice acuminado, base redondeada desigual, a veces ligeramente lobulado. Nervadura con 3-5 venas secundarias derivadas sobre todo de la parte inferior de la nervadura central, curvados hacia el ápice. Peciolos de 6-16 mm de largo, invaginado en la base, en ocasiones con una estructura similar a una lígula. Profilos de 10-20 mm de largo, agudos, pubescentes. Inflorescencias de 4-8 cm de largo y 2-4 mm de ancho en el fruto, pedúnculos cortos y gruesos de 3-12 mm de largo. Presenta anteras de 0.2-0.4 mm de largo, brácteas florales de 0.7-1 mm de ancho, semi-lunar o triangulares, densamente amarillo. Frutos de 1-1.5 mm de ancho, ovoides, redondo desde arriba, con densa cubierta de pelos

marrones amarillentos, tres estigmas, lineal, con depresión en la parte superior de la fruta (Standley, & Steyermark, 1952; Stevens, et al., 2001; Tebbs, 1993).

4.5.2.4 Distribución geográfica y hábitat

Especie muy común en matorrales o bosques húmedos o mojados, a veces en los bosques de pino, a una altura menor de 900 m. Ha sido reportada en Petén, Alta Verapaz, Izabal, Escuintla, Santa Rosa (Standley, & Steyermark, 1952; Stevens, et al., 2001).

4.5.2.5 Usos etnomédicos y modo de empleo

Se utiliza para el dolor de estómago (digestivo), catarros, fiebre, dolor de cabeza, dolor, diabetes, enfermedades renales y nerviosas (Cruz, et al., 2008).

4.5.2.6 Actividad farmacológica y biológica

El extracto etanólico de tiene una amplia actividad contra microorganismos a dosis <1 mg/mL; en el tamizaje contra protozoos se encontró potente actividad contra *Leishmania mexicana* (24 µg/mL), *Plasmodium falciparum* (11 µg/mL) y *Trypanosoma cruzi* (12 µg/mL) (Cruz, et al., 2005b).

El extracto diclorometánico posee actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *M. smegmatis*, *C. neoformans* (Véliz, et al., 2006). Así mismo, los extractos diclorometánicos y metanólicos presentaron actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis* (Gómez, 2007).

La infusión al 10 % de la hoja tiene actividad antiinflamatoria a dosis de 750 y 1000 mg/kg de peso corporal in vivo (Hernández, 2007).

Su aceite esencial posee actividad citotóxica y larvicida contra *A. albimanus* y *A. aegypti* (Cruz, et al., 2005c).

4.5.2.7 Composición química

Las hojas contienen nerolidol, α -pineno y linalool (en un porcentaje elevado). El aceite esencial de las hojas contiene citonelal, linalool (69.4%), nerolidol (8%) α -pineno

(3.2%) y cineol, limoneno y citral, β -pineno, δ -3-careno, bornileno, δ -elemeno, 1,5 ciclodecadieno, β -cariofileno y D-germacrano (Cruz, et al., 2005b).

4.5.3 Nombre científico

Piper oradendron Trel, & Standl

4.5.3.1 Sinonimias

No se encontraron.

4.5.3.2 Nombres comunes

Cordoncillo (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.3.3 Descripción botánica

Arbusto de 1-2.5 m de alto, de ramas delgadas, densa y minuciosamente hispida, entrenudos superiores cortos; peciolo delgado de 1-2 cm de largo, minuciosamente hispido, dilatado en la base; hojas delgadas como láminas, generalmente de color verde o verde oscuro cuando están secas, ligeramente brillantes, ovaladas o elíptico-ovaladas, sobre todo de 13-18 cm de largo y de 6-9 cm de ancho, acuminadas abruptamente o acuminadas a lo largo, oblicuas y desiguales visiblemente en la base, generalmente agudas por un lado y obtuso o redondeado en el otro, por lo general bastante suaves al tacto; pedúnculos opuestos a las hojas de aproximadamente 6 mm (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.3.4 Distribución geográfica y hábitat

Arbusto común de las colinas y llanuras de la vertiente del Pacífico. Se halla en matorrales o bosques mixtos de 1,200 msnm o menos. Hasta el momento es encontrada en Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Retalhuleu y San Marcos (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.3.5 Actividad farmacológica y biológica

Según la revisión en la base de datos Natural Products Alert Database (NAPRALERT) no se encontró estudios sobre su bioactividad.

4.5.3.6 Composición química

Las hojas de *P. oradendron* contienen alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceite volátil y cumarinas. Los aceites esenciales contienen β -pineno, germacreno e iso-espatulenol se presentan como mayoritarios y citonelal, linalool, cineol, limoneno y citral (Cruz, et al., 2008; Martínez, 2009).

4.5.4 Nombre científico

Piper patulum Bertol.

4.5.4.1 Sinonimias

Piper marginatum Jacq.; *P. quiriguanum* Trel. & Standl (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.4.2 Nombre común

Cordoncillo (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.4.3 Descripción botánica

Es un arbusto delgado, de 2-3 m de altura, erecto, escasamente bifurcado, peciolo delgados de 2.5-7 cm de longitud, invaginado por la mitad de su longitud o más. Sus hojas frescas son flácidas, característica que disminuye posteriormente, finas y densas, de 10-20 cm de longitud y de 7.5-15 cm de ancho, delgada en punta y gruesa en la base, con lóbulos basales alrededor, verde oscuro en la parte superior y pálido en la parte inferior, con aproximadamente nueve enervaciones delgadas, poco prominentes a diferencia de las venas que son bastante prominentes, pedúnculos fuertes frente a las hojas, de 1 cm de longitud o menos, puntos largos y delgados usualmente curvados ligeramente, de 12-16 cm de longitud y de 2.5-3 mm de grosor (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.4.4 Distribución geográfica y hábitat

Es una planta muy común en muchas regiones, especialmente en el Pacífico; se encuentra en montañas a una altura menor de 1200 msnm o en bosques de tierras bajas; en climas desde húmedos a mojados, o bastantes secos; Alta Verapaz, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Chimaltenango, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, Sur de México, Honduras, El Salvador (Standley, & Steyermark, 1952).

4.5.4.5 Actividad farmacológica y biológica

Su aceite esencial de hojas posee actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*, a una concentración de 0.5 mg/mL y actividad antibacteriana contra *M. smegmatis* y *B. subtilis* a 100 µg/mL (Cruz, et al., 2005c).

4.5.4.6 Composición química

La hoja de *P. patulum* contiene alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceite volátil y cumarinas (Cruz, et al., 2008).

Su aceite esencial contiene α -pineno, β -pineno, α -terpineno, 1-metil-5-ciclohexano, (+)-3-careno, α -terpinoleno, transanetol, β -cariofileno, miristicina, α -humuleno, benzonitrilo, 1,6,10dodecatrien-3-ol, biciclogermacrano, trans-azarona, β -eudismol (Cruz, et al., 2005c).

4.6 Partición líquido-líquido

La partición líquido-líquido es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente (Fuentes, 2007; Pietrzyk, & Frank, 1983).

En la práctica, es muy utilizada para separar compuestos orgánicos de las soluciones o suspensiones acuosas en las que se encuentran. El procedimiento consiste en agitarlas con un disolvente orgánico inmiscible con el agua y dejar separar ambas capas. Los distintos solutos presentes se distribuyen entre las fases acuosas y orgánicas, de acuerdo con sus solubilidades relativas, de este modo, las sales inorgánicas, prácticamente insolubles en los

disolventes orgánicos más comunes, permanecerán en la fase acuosa, mientras que los compuestos orgánicos que no forman puentes de hidrógeno, insolubles en agua, se encontrarán en la orgánica (Fuentes, 2007; Pietrzyk, & Frank, 1983).

4.7 Demostración de la actividad antioxidante y biocida *in vitro*

La actividad biocida se refiere a la capacidad de una sustancia para causar la muerte o inhibir la proliferación de determinados organismos. Esta actividad puede ser detectada por medio de una serie de ensayos biológicos *in vitro* (bioensayos). Los bioensayos han sido empleados exitosamente en varios estudios realizados alrededor del mundo. Dentro de la actividad biocida se encuentra la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) y larvicida en las especies vegetales (Guerrini, et al., 2009; Lago, et al., 2009; Okunade, Hufford, Clark, & Lentz, 1997; Repetto, & Sanz, 1993).

4.7.1 Determinación de la actividad antioxidante

La excesiva oxidación de biomoléculas da lugar a diversos daños en el organismo. Los radicales libres son responsables de enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardíacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral, aceleración del envejecimiento, etc. (Fuentes, 2007; López, Rojano, & Lobo, 2007; Pietrzyk, & Frank, 1983; Rivero, & Betancort, 2006).

Las plantas contienen una amplia variedad de compuestos con capacidad de atrapar especies reactivas del oxígeno (vitaminas, carotenoides, alcaloides, aminos, betalaínas e incluso ciertos terpenoides), los metabolitos más reconocidos por su actividad antioxidante son los de naturaleza fenólica: ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos y taninos (Murillo, Lombo, Tique, & Méndez, 2007).

4.7.1.1 Método de DPPH

El bioensayo *in vitro*, utilizado para evaluar la actividad antioxidante de los extractos es la metodología propuesta por Blois en 1958, la cual utiliza como indicador de la actividad antioxidantes el α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH), molécula que presenta un radical libre estable que acepta un electrón de la muestra para aparearse. El DPPH como

radical libre en solución etanólica presenta un color violeta intenso cuando reacciona con la muestra, el electrón se aparea y la solución cambia de coloración (Pietrzyk, & Frank, 1983).

4.7.1.2 Determinación de la actividad antioxidante por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido: 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Es reportado como un ensayo de decoloración, aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos, como hidrofílicos, incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides y antioxidantes plasmáticos: El radical pre-formado monocatiónico de (ABTS⁺) es generado por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y es reducido en la presencia de antioxidantes donadores de protones. Este ensayo mejora, en diversas formas, al ensayo original (ensayo mioglobina férrica/ABTS) para la determinación de la actividad antioxidante. La química involucra la generación directa del radical monocatiónico ABTS, sin involucrar un radical intermedio. Es un ensayo de decoloración, por tanto, el radical catiónico es pre-formado previo a su adición al ensayo de sistemas antioxidantes, en lugar de que la generación del radical tome lugar continuamente en la presencia del antioxidante (Re, et al., 1999).

4.7.1.3 Determinación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Generalmente se encuentran en forma de complejos, como polifenoles polimerizados o en forma de pequeños monómeros llamados ácidos fenólicos (Lock, 1994; Trease, 1991).

Los fenoles se comportan como antioxidantes, sustancias eliminadoras de radicales oxígeno y que suprimen la oxidación de las cadenas lipídicas por los radicales libres, además, actúan como antioxidantes en muchos sistemas biológicos. En general, su actividad antioxidante es atribuida a la capacidad de los fenoles de formar, en primer lugar, radicales fenoxil estabilizados por resonancia después de reaccionar con radicales peroxilo o con la ferrilmioglobina (Laranjinha, Vieira, Madeira, & Almeida, 1995).

Para determinar la presencia de fenoles en un extracto se ha utilizado generalmente el reactivo de Folin-Ciocalteu el cual al reaccionar con los fenoles presentes en la solución puede medirse a una longitud de onda de 765 nm.

4.7.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo*. La medición de esta actividad puede hacerse por métodos de difusión y dilución. El método de difusión se usa como un procedimiento cualitativo, semicuantitativo y a veces cuantitativo, generalmente los microorganismos son categorizados como resistentes, intermedios o susceptibles para cada agente. El método de dilución se usa para determinar la CIM que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo (Benítez, 2008; Cáceres, et al., 1998; CYTED, 1993; España, Velez, & Cáceres, 1994; Mitscher, Leu, Bathala, Wu, & Beal, 1972; Mitscher, Drake, Gollapudi, & Okwute, 1987).

4.7.3 Determinación de la actividad antifúngica

Los procedimientos son similares a los antimicrobianos, el crecimiento de hongos filamentosos inoculados en medios de cultivo adecuados es inhibido por las moléculas bioactivas diluidas en el medio de Agar (Silva, et al., 2009).

El tamizaje consiste en evidenciar *in vitro* como un extracto, derivado de una droga vegetal inhibe el crecimiento de un hongo en condiciones estándar, cuando se maneja una concentración previamente determinada conocida como punto de corte (entre 500-1000 mg/mL) (Re, et al., 1999).

4.7.4 Determinación de la actividad larvicida

Consiste en evaluar la actividad de los extractos vegetales para matar larvas de insectos de importancia médica en un medio micrométrico líquido, utilizando larvas de *S. aegypti* y *A. albimanus*. Los artrópodos hematófagos presentan varios estadios con características morfológicas y fisiológicas diferentes, estos estados de las larvas se pueden enfrentar a diluciones de extractos para determinar su actividad larvicida en un modelo *in vitro* usando una concentración de 100 µg/mL para el tamizaje y concentraciones decrecientes para determinar las dosis larvicida (Benítez, 2008; Silva, et al., 2009).

5. JUSTIFICACIÓN

El género *Piper* comprende 10 géneros y aproximadamente 1,400 a 2,000 especies y presenta una extensa aplicación etnobotánica en América Latina. Estudios previos han demostrado que dichas especies poseen una gran diversidad biológica y química. Los aceites esenciales presentan diferentes tipos de moléculas como sesquiterpenos, monoterpenos, arilpropanoides, motivo por el cual su estudio se convierte en una actividad promisoriosa y de importancia.

Para esta investigación se seleccionaron cuatro especies de este género, que se sabe, presentan algunas actividades biológicas como antioxidante y biocida, siendo objeto de la presente investigación *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*. Este estudio pretende proporcionar información sobre la actividad de fracciones orgánicas de las cuatro especies en búsqueda de sugerir el tipo de molécula involucrada al analizar la actividad en sus particiones.

A pesar de la diversidad de estudios realizados sobre este género, todavía se desconocen muchos de los principios activos a los que se les atribuye la actividad de estas plantas; por lo que en este estudio también se pretende, a través de la partición líquido-líquido, definir cuál de las particiones presenta mejor actividad terapéutica demostrada en modelos *in vitro* (antioxidante, antimicrobiana, antifúngica o larvicida). Estos datos permitirán contribuir a la información de las monografías de las especies estudiadas.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Contribuir al estudio fitoquímico y biológico de cuatro especies del género *Piper* nativas de Guatemala.

6.2 Específicos

6.2.1 Realizar una partición líquido-líquido del extracto etanólico de cuatro especies de *Piper* con disolventes de polaridad creciente.

6.2.2 Evaluar la actividad biocida y antioxidante, por tres procedimientos, de las particiones de diferente polaridad de cuatro especies de *Piper*.

6.2.3 Determinar la CIM y la DL₅₀ de las particiones orgánicas de cuatro especies de *Piper* que presenten una actividad positiva.

7. HIPÓTESIS

De las particiones del extracto etanólico de las cuatro especies de *Piper* investigadas, al menos una de las particiones posee actividad biocida y antioxidante.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Universo de trabajo

8.1.1 Universo

Especies nativas de Guatemala del genero *Piper* usadas popularmente para el tratamiento de enfermedades.

8.1.2 Población

Extractos etanólicos de cuatro plantas del género *Piper* nativas de Guatemala a las cuales se les atribuye una actividad antioxidante, antibacteriana, antifúngica y larvicida.

8.1.3 Muestra

Particiones con hexano, acetato de etilo, metanol y etanol de *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*.

8.2 Recursos

8.2.1 Recursos Humanos

8.2.1.1 Autoras

Br. Andrea Cristina Ovalle Morales

Br. Eva María Palacios Castañeda

Br. Keila Noemí Abdalla Mansilla

Br. Lesly Saraf Juárez García

8.2.1.2 Asesor de trabajo de investigación

Lic. Armando Cáceres Estrada

8.2.1.3 Revisora del trabajo de investigación

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández

8.2.2 Recursos Físicos

8.2.2.1 Instalaciones

Laboratorio de Bioensayos del Departamentos de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.

Laboratorio FARMAYA, S.A.

Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

8.2.2.2 Organismos de Experimentación

8.2.2.2.1 Bacterias

<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

8.2.2.2.2 Hongos

<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 204304
<i>Aspergillus oryzae</i>	ATCC 29293
<i>Aspergillus niger</i>	ATTC 9029
<i>Mycrosporium canis</i>	ATCC 36299
<i>Mycrosporium gypseum</i>	C 115 2000
<i>Trychophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9972
<i>Trychophyton rubrum</i>	C 113 2000

8.2.2.2.3 Larvas

<i>Anopheles albimanus</i>	MSPAS, Programa de Malaria
<i>Stegomyia aegypti</i>	MSPAS, Programa de Malaria

8.2.2.2.4 Levaduras

<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Cepa salvaje

8.2.2.3 Equipo

Agitador
Autoclave
Balanza analítica y semianalítica
Baño de maría Büchi
Cámara de revelado
Campana bacteriológica con flujo laminar
Campana de extracción de gases
Desecadora
Espectrofotómetro Agilent 8453
Estereoscopio
Estufa eléctrica con agitador
Fuente de luz artificial
Incubadoras a 25°C y 37°C VWR™
Lámpara de luz UV/VIS
Mechero
Microscopio
Percolador de acero inoxidable
Pipeta automática de 100 a 1,000 µL
Pipeta automática de 20 a 200 µL
Refrigeradora
Rotavapor Büchi
Sistema de enfriamiento o circulación de agua
Vórtex

8.2.2.4 Materiales

Algodón
Asa bacteriológica en argolla
Cajas de Petri cuadriplate y simples
Cámara de Neubauer
Cromatofolios de sílica gel 60F254
Gradilla para tubos con capacidad de 10 mL
Jeringas estériles de 1 y 5 cc
Microplacas
Papel filtro
Papel parafilm
Pinzas de metal
Plantilla para siembra
Puntas amarillas de 200 μ L
Puntas azules de 1,000 μ L
Regla graduada en mm
Soporte metálico con aro
Viales

8.2.2.5 Cristalería

Ampolla de decantación
Balón volumétrico de diversos volúmenes
Balones aforados de diversos volúmenes
Campanillas de Durham
Erlenmeyers de diversos volúmenes
Frascos de vidrio color ámbar con tapadera de rosca
Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL y 10 mL
Probetas de diversos volúmenes
Tubos con tapón de rosca de 15 mL
Tubos de ensayo con capacidad de 10 mL

Vasos de precipitar

8.2.2.6 Reactivos

1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Ácido 2,2'-azin-obis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS)

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trólox)

Acetato de sodio 0.2 M

Ácido acético 0.2 M

Ácido gálico

Agua de chorro

Agua desmineralizada

Dextrosa

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Disolventes (hexano 1L, acetato de etilo 1L, metanol 1L, etanol 50%, 70%, 95%)

Etanol al 50% y 70%

Fosfato diácido de potasio

Hidróxido de sodio (NaOH)

Peptona

Persulfato potásico

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Solución de carbonato de sodio

Solución salina

Sulfato de sodio

8.2.2.7 Medios de Cultivo

Agar-agar

Agar Mueller Hinton

Agar Saboraud

Caldo Trypticase Soya

8.3 Procedimiento

8.3.1 Obtención del extracto etanólico (EE) por percolación

8.3.1.1 Llenado del percolador (Re, et al., 1999)

- Se colocó en un percolador, previamente limpio y seco, un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- Se pesaron 200 g de materia vegetal a utilizar, de acuerdo al tamaño del percolador.
- Se humedeció el material vegetal con etanol para la extracción, utilizando un vaso de precipitar.
- Se transfirió todo el material al percolador y se agregó etanol hasta cubrir el material vegetal (hasta una pulgada sobre el nivel de materia vegetal).
- Se dejó reposar 48 h para llevar a cabo la extracción, lo cual dependió de la cantidad de materia que se utilizó.
- Se abrió la llave de la parte inferior y se dejó gotear el líquido a una velocidad adecuada.
- Se recogió el percolado en un erlenmeyer y se agregó etanol extra, según se requerimiento, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio.
- Se presionó fuertemente el material sólido que quedó y el líquido obtenido se añadió al percolado obtenido anteriormente.
- Se concentró el líquido obtenido (menstruo) utilizando un equipo de rotavapor a temperatura de 40°C y presión reducida.
- Se repitió el procedimiento hasta que se agotó la droga con el disolvente recuperado (Anexos, fotografía 4).

8.3.1.2 Concentración en rotavapor (Re, et al., 1999)

- Se verificó que estuvieran conectadas todas las conexiones eléctricas.
- Se colocó el balón colector de solvente, asegurándolo con una pinza.
- Se agregó agua destilada al baño de calentamiento.
- Se encendió el baño y se mantuvo la temperatura entre 45°C, dependiendo del equipo puede haber pérdidas de 10-20°C entre el baño de calentamiento y el interior del balón de evaporación, en todo caso el balón de evaporación no deberá tener una temperatura mayor de 40°C.

- Se revisó que la llave de alimentación del refrigerante esté cerrada.
- Se llenó el balón con el percolado hasta la mitad.
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó al vástago con la llave correspondiente.
- Se encendió el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada (50 a 80 revoluciones).
- Se conectó un sistema de enfriamiento (bomba de agua) y se agregó hielo a la hielera, se dejó enfriar aproximadamente 5 min.
- Se mantuvo siempre el refrigerante frío, cambiando regularmente los hielos.
- Se encendió la bomba de vacío durante el tiempo necesario para iniciar la destilación.
- Se apagó la bomba de vacío cuando inició la destilación.
- Se encendió la bomba de vacío cuantas veces fue necesario hasta que se agotó el disolvente del balón de evaporación o ya no destiló ningún líquido (Anexos, fotografía 4).

8.3.2 Obtención de particiones hexánica (PH), acetato de etilo (PA), etanólica (PE) a partir de partición líquido-líquido (Fuentes, 2007)

- Se maceró o extrajo usando un disolvente inicial de amplio espectro (etanol).
- Se manejó la ampolla de decantación con ambas manos, con una se sujetó el tapón, asegurándolo con el dedo índice y con la otra se manipuló la llave.
- Se colocó en posición normal el embudo, se retiró el tapón y se depositó por la parte superior el extracto en etanol, seguido por los disolventes orgánicos: hexano y acetato de etilo.
- Se colocó de nuevo el tapón y se aseguró con el dedo índice.
- Se invirtió el embudo y se abrió la llave para eliminar la presión de su interior, se agitó con suavidad durante uno o dos segundos y se abrió de nuevo la llave; cuando dejó de aumentar perceptiblemente la presión en el interior, se aseguró el tapón y la llave y se agitó enérgicamente durante uno o dos minutos; se puso de nuevo en contacto con la atmósfera a través de la llave, se volvió a cerrar ésta y se apoyó, ya en posición normal, en el soporte metálico (Anexos, fotografía 6).

- Se destapó y se dejó en reposo hasta que fue nítida la separación entre las dos capas de líquido (en la parte inferior debe tenerse siempre un vaso de precipitados de gran tamaño con objeto de poder recoger todo el líquido en caso de que el embudo se rompiera por accidente).
- Se sacó la parte inferior de las fases separadas por la llave y la superior por la boca, previniendo así posibles contaminaciones.
- Se realizaron como mínimo tres extracciones.

8.3.3 Actividad antioxidante

8.3.3.1 Actividad antioxidante total mediante el reactivo de DPPH (López, et al., 2007; Murillo, et al., 2007; Rivero, & Betancort, 2006)

8.3.3.1.1 Solución de DPPH 500 μ M en metanol

- Se pesaron 10.95 mg de reactivo de DPPH y se disolvieron en 50 mL de metanol. Se agitó la solución y se conservó en un recipiente color ámbar. Se debe preparar el día que se va a utilizar.

8.3.3.1.2 Amortiguador de acetato

- Se preparó una solución acuosa de acetato de sodio 0.2 M y 19 mL de acetato de sodio 0.2 M; se llevó a pH 6.0 mediante NaOH 6N (se preparó disolviendo 24 g de NaOH en 100 mL de agua desmineralizada).

8.3.3.1.3 Preparación de los tubos de reacción

Se prepararon tubos de vidrio recubiertos con papel de aluminio:

- Blanco de control: 1 mL de amortiguador de acetatos + 2 mL de metanol.
- Control: 1 mL de amortiguador de acetatos + 1.5 mL de metanol + 0.5 mL de Solución DPPH.
- Blanco de ensayo: 1 mL de amortiguador de acetatos + 1.9 mL de metanol + 0.1 mL de muestra.

- Ensayo: 1 mL de amortiguador de acetatos + 1.4 mL de metanol + 0.5 mL de solución DPPH + 0.1 mL de muestra.
- Se agitaron los tubos preparados en un vórtex durante 30 seg y se incubaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz durante 30 min. Se leyó las absorbancias de cada tubo a una longitud de onda de 517 nm (siempre se debe leer la absorbancia del control y del ensayo versus el blanco respectivo). Se realizaron los ensayos por triplicado (Anexos, fotografía 8).

8.3.3.1.4 Preparación de la curva de lectura

- Se realizaron las siguientes diluciones del extracto con metanol: 1:5, 2:3, 3:2, 4:1 y 5:0. Las mediciones de cada dilución se realizaron siguiendo el paso de la preparación de tubos de reacción. Cada dilución correspondió a una muestra. Se realizaron los ensayos de las diluciones por triplicado.

8.3.3.1.5 Registro de los resultados de la curva y cálculo del porcentaje de inhibición de la absorbancia.

- Se leyó dos veces la absorbancia, se calculó el promedio y el porcentaje de inhibición de la concentración, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \%$$

8.3.3.1.6 Cálculo de la concentración de la materia seca vegetal.

- Se determinó el peso de la planta en fresco, peso seco y el volumen final del extracto obtenido. Se determinó la concentración de la materia seca vegetal utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso en fresco} * \text{Peso seco}}{\text{Volumen final}} = \text{g/mL} * 100 \text{ mg/mL} = \text{mg/mL}$$

8.3.3.1.7 Cálculo de la concentración de inhibición al 50% (IC₅₀)

- Los datos utilizados para el cálculo de la regresión lineal fueron: dilución, porcentaje de inhibición de la concentración y concentración de materia seca vegetal. Se determinó la concentración por medio de regresión lineal.

8.3.3.2 Actividad antioxidante por el método ABTS (Re, et al., 1999)

- Se obtuvo el radical a través de la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM) incubados a temperatura ambiente (25°C) y en la oscuridad por 16 h, ya formado el radical ABTS^{•-}, se diluyó con etanol absoluto hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70±0.02, a una longitud de máxima absorción de 734 nm.
- Se diluyó el extracto con 2 mL de etanol absoluto, a 20 µL de esta solución se añadieron 980 µL de dilución del radical ABTS^{•-} y se midió la absorbancia del blanco y del extracto al minuto 1 y al minuto 7 (Anexos, fotografía 9).
- Para conocer la capacidad antioxidante de los extractos se elaboraron curvas estándar de antioxidante sintético de referencia: trólox, quercitina, rutina, TBHQ, vitamina C y vitamina E.
- Se ensayó trólox, a una concentración de 0-15 µM, que es la concentración final en etanol, bajo las mismas condiciones.
- Se calculó la regresión lineal y se obtuvieron las ecuaciones de la curva. Se expresaron los resultados en TEAC (actividad antioxidante equivalente a trólox), la cual representó la concentración de solución de trólox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC se determinaron de la siguiente forma:

$$\Delta A_{\text{trólox}} = (A_{T=0 \text{ trólox}} - A_{T=6 \text{ trólox}}) - \Delta A_{\text{solvente}} (0-6 \text{ min})$$

$$\Delta A_{\text{trólox}} = m[\text{trólox}]$$

$$\text{TEAC}_{\text{extracto}} = (\Delta A_{\text{extracto}}/m)d$$

Donde AA = reducción de la absorbancia, A = absorbancia al tiempo dado, m = pendiente de la curva estándar, [trólox] = concentración de trólox, d = factor de dilución.

8.3.3.3 Determinación de fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (Laranjinha, et al., 1995; Lock, 1998; Trease, 1991)

8.3.3.3.1 Solución de carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) al 10% p/v

- Se pesaron en balanza analítica 10 g de carbonato de sodio anhidro con una espátula plástica y se disolvieron en 100 mL de agua desmineralizada. La solución se agitó y se conservó en un recipiente color ámbar.

8.3.3.3.2 Solución de ácido gálico anhidro ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) 1 mg/mL

- Se pesaron 8 mg de ácido gálico anhidro en una balanza analítica y se disolvieron en 8 mL de agua desmineralizada.
- Se diluyó 10X, es decir, se realizó una dilución 1:10 (1 mL de la solución de ácido gálico 1 mg/mL en 9 mL de agua), se conservó en un frasco color ámbar.

8.3.3.3.3 Preparación de los tubos de reacción y de la curva de lectura

- Se preparó una serie de tubos que contenían los reactivos que se citan en la tabla posterior.
- Los tubos rotulados como muestra 1 a y muestra 1 b fueron tubos que contenían la misma muestra con distintos volúmenes.
- Se agitaron los tubos en un vórtex durante 30 seg, luego se incubaron en el baño de María en un rango de 90-100°C durante 1 min.
- Se dejaron enfriar y se leyó la absorbancia de cada uno de ellos, a 765 nm. Se realizó el ensayo por triplicado.

	H ₂ O (mL)	Acido gálico (μL) Sol. 1 μg/10μL	Reactivo Folin- Ciocalteu (mL)	Na ₂ CO ₃ 10% (mL)
Blanco	4.000	0	0.4	0.8
Patrón 1	3.975	25	0.4	0.8
Patrón 2	3.950	50	0.4	0.8
Patrón 3	3.900	100	0.4	0.8
Patrón 4	3.850	150	0.4	0.8
Patrón 5	3.800	200	0.4	0.8
Patrón 6	3.750	250	0.4	0.8
Muestra 1 a	3.950	50	0.4	0.8
Muestra 1 b	3.900	100	0.4	0.8

8.3.3.3.4 Registro de los resultados de la curva y cálculo de la concentración de fenoles expresado en µg equivalente de ácido gálico por gramo de peso seco

- Se registraron los valores obtenidos de la curva, con base en la siguiente tabla:

Dilución o control	Medición de absorbancia 1	Medición de absorbancia 2	Promedio de absorbancias	Concentración µg (Equivalentes de ácido gálico)
Blanco				N/A
Patrón 1				2.5
Patrón 2				5.0
Patrón 3				10.0
Patrón 4				15.0
Patrón 5				20.0
Patrón 6				25.0

- Se estimó la media de la absorbancia 1 y 2, en la casilla promedio de absorbancias.
- Se realizó la regresión lineal de los datos de la curva de calibración, graficando en el eje de las abscisas (y) el promedio de las absorbancias y en el eje de las ordenadas (x) la concentración en µg equivalentes de ácido gálico.
- Se registraron los datos de la muestra utilizando la siguiente tabla:

Repetición No.	Extracto	
	Muestra 1 a Absorbancia	Muestra 1 b Absorbancia
1		
2		
Media		
	Concentración en µg (Equivalentes de ácido gálico/ mg peso seco)	Concentración en µg (Equivalentes de ácido gálico/ mg peso seco)
Media		

- Se obtuvo la media de las absorbancias de la muestra y se determinó la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta, despejando “x”.
- El resultado así obtenido se utilizó para calcular los µg equivalentes de ácido gálico/mg peso seco.
- Se realizó el cálculo de la siguiente forma:

$$\mu\text{g equivalente de ácido gálico/mg peso seco} = \frac{\text{Resultado obtenido en la ecuación de la línea recta } (\mu\text{g})}{\text{Volumen medido (mL)}} * \frac{\text{g peso seco}}{\text{mL extracto}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

8.3.4 Actividad biocida

8.3.4.1 Actividad antimicrobiana (Burlingame, & Reddish, 1973; Cáceres, López, González, Berger, & Tada, 1988; CYTED, 1993; España, et al., 1994; Mitscher, et al., 1987; Mitscher, et al., 1972; Re, et al., 1999)

8.3.4.1.1 Disolución del extracto

- En una balanza analítica se pesaron 30 mg de extracto a ensayar y se disolvieron en 3 mL de etanol al 50% (se hicieron cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo).
- Se agitó en un vórtex hasta que se disolvió bien (si no se disuelve, utilizar un sonicador). En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25 μ L de DMSO.
- Se filtró el extracto.

8.3.4.1.2 Filtración de extracto

- Se trabajó la filtración en una campana de flujo laminar (previamente limpia, ver PEO de limpieza de campana).
- Se aspiró el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL.
- Se desenroscó la aguja y se enroscó en la jeringa el filtro de 0.45 μ m de diámetro.
- En un frasco estéril se recibió el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

8.3.4.1.3 Preparación de agar-planta para tamizaje

- Se prepararon tubos con 9.0 mL de agar Mueller Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar).
- Se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, se dejaron enfriar a 50°C.
- En cajas de Petri simple se agregó 1.0 mL de solución del extracto y partición, filtrados (los cuales debían tener una concentración de 10 mg/mL) y los 9 mL de agar Mueller Hinton.
- Se taparon las cajas y se homogenizaron con movimientos circulares. La concentración final que se obtuvo, en cada una de ellas, fue de 1 mg/mL.

- Se dejaron solidificar y se incubaron a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Se guardaron en refrigeradora hasta el momento de usar.

8.3.4.1.4 Preparación del inóculo de bacterias y levaduras

- Se purificaron los microorganismos a ensayar inoculándolos en cajas de Petri con agar Tripticasa Soya, se incubaron a 36°C durante 24 h para bacterias y 48 h para levaduras.
- Se inoculó una asada del cultivo puro microbiano, en tubos con 5.0 mL de caldo Tripticasa Soya, se incubaron a 36°C durante 24 h para bacterias y 48 h para levaduras.
- Bacterias: se diluyeron 0.05 mL de la suspensión anterior en 4.95 mL de solución salina estéril (dilución 1:100).
- Levaduras: se diluyeron 0.5 mL de la suspensión anterior en 4.5 mL de solución salina estéril (dilución 1:10).

8.3.4.1.5 Demostración de la actividad antibacteriana

- Se inoculó en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Se realizaron cuatro repeticiones por microorganismo. Se dejaron reposar durante 5-10 min y se incubaron a 36°C durante 24 h para bacterias y 48 h para levaduras.
- Se utilizó como control negativo de actividad antibacteriana, 9 mL de Agar Mueller Hinton mezclado con 1 mL de etanol al 50%.
- Se utilizó como control positivo de actividad antibacteriana, diluciones del antibiótico amoxicilina/ácido clavulánico, hasta obtener CIM (Anexos, fotografía 10).

8.3.4.1.6 Lectura e interpretación de resultados

- Si hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad negativa
- Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad positiva.
- Presencia de microorganismos fuera de la inoculación = contaminación.

8.3.4.1.7 Demostración de la CIM

- Se preparó el inóculo de bacterias y levaduras como se indicó con anterioridad.
- Se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 3.9, 4 mL de agar Mueller Hinton.
- Se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 min, se dejaron enfriar a 50°C y se agregó la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadriplate de la siguiente manera:

3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto= 1.0 mg/mL

3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto= 0.5 mg/mL

3.9 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto= 0.25 mg/mL

- Se dejó un cuadrante con 4.0 mL de agar como control negativo.
- Se dejaron solidificar y se incubaron a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.
- Se guardaron en refrigeración hasta el momento de usar.
- Se inocularon tres estrías en cada uno de los cuadrantes y se incubaron a 36°C durante 24 h para bacterias y 48 h para levaduras (Anexos, fotografía 11).

8.3.4.1.8 Lectura e interpretación de resultados

- Se determinó la CIM, observando en qué concentración del extracto, se inhibió el crecimiento de la bacteria, guiándose por los siguientes parámetros.
- Si hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad negativa.
- Si no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo = actividad positiva.
- Presencia de microorganismos fuera de la inoculación = contaminación.

8.3.4.2 Actividad antifúngica (Brancato, & Golding, 1983; Burlingame, & Reddish, 1973; Cáceres, López, Juárez, del Águila, & García, 1993; MacCarthy, Pitts, Gunawardana, Kelly-Borges, & Pomponi, 1992; MacRae, Hudson, & Towers, 1988; Re, *et al.*, 1999; Vanbrenseghem, De Vroey, & Takashio, 1970)

8.3.4.2.1 Disolución del extracto

- En una balanza analítica se pesaron 30 mg de extracto a ensayar y se disolvieron en 3 mL de etanol al 50% (hacer cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo).
- Se agitó en un vórtex hasta que se disolvió bien (si no se disuelve, utilizar un sonicador). En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25 μ L de DMSO.
- Se filtró el extracto.

8.3.4.2.2 Filtración de extracto

- Se trabajó la filtración en una campana de flujo laminar (previamente limpia, ver PEO de limpieza de campana).
- Se aspiró el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 mL.
- Se desenroscó la aguja y se enroscó en la jeringa el filtro de 0.45 μ m de diámetro.
- En un frasco estéril se recibió el filtrado haciendo pasar la disolución del extracto por el filtro lentamente.

8.3.4.2.3 Preparación de agar-planta para tamizaje

- Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.
- Se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°C, se dejaron enfriar a 50°C y se agregaron 1.5 mL del extracto de la planta a probar (Dilución 1:10), se agitó. La concentración final que se obtuvo es de 1 mg/mL.
- Se vertieron en cajas de Petri estériles, se dejaron solidificar, se abrieron cuatro agujeros con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro (en forma equidistante) y se incubaron a 36°C durante 24 h para chequear esterilidad.
- Se guardaron en refrigeración hasta el momento de su uso.

8.3.4.2.4 Preparación de inóculo de hongos filamentosos

- Se preparó medio de esporulación Takashio (Sabouraud modificado para producción de esporas) con los siguientes ingredientes:

Dextrosa	0.6 g
NaSO ₄	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Peptona	0.3 g
Agar-agar	6.0 g

- Se agregaron a 300 mL de agua, se disolvieron, se vertieron 6 mL en tubos con tapón de rosca, se esterilizaron en autoclave y se dejaron solidificar con el mayor declive posible. Se incubaron por 48 h a 25°C para descartar contaminación.
- Se sembraron en este medio los hongos a ensayar y se incubaron a 27°C durante 21 días, hasta obtener un crecimiento homogéneo (aproximadamente 15 días).
- Se agregaron 2 mL de agua destilada estéril a cada tubo y se desprendió el hongo con ayuda de una varilla.
- Se trasvasó el material obtenido a viales con tapa de rosca. Se agitó 1 min en agitador y se realizó un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
- La suspensión se estandarizó a 100 esporas/ μ L, que es igual a 1×10^5 esporas/mL (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y se almacenó en viales estériles en refrigeración a 4°C.

8.3.4.2.5 Demostración de la actividad antifúngica

- Se inocularon 30 μ L de la suspensión de esporas en los agujeros del agar-planta. Se incubaron a 27°C por 14 días.
- Se utilizó como control negativo de actividad antifúngica, 13.5 mL de Agar Sabouraud mezclado con 1.5 mL de alcohol al 70%.
- Se utilizó como control positivo de actividad antifúngica, 13.5 mL de Agar Sabouraud mezclado con 1.5 mL de diluciones del antimicótico fluconazol.

8.3.4.2.6 Lectura e interpretación de resultados

- Se midió el diámetro de la colonia del hongo en mm.
- Se calculó el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas control.

- Se tomó como positivo el extracto que reduce el diámetro de la colonia en 75% (Anexos, fotografía 12).

8.3.4.2.7 Demostración de la CIM

- Se preparó el inóculo de hongos filamentosos como se indicó con anterioridad.
- Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud.
- Se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°C, se dejaron enfriar a 50°C y se agregaron 1.5 mL de la dilución respectiva, del extracto de la planta a probar, se agitaron. Se prepararon las diluciones con la siguiente fórmula:

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

Donde V_1 = volumen necesario del extracto, C_2 = concentración necesaria (1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.0625, respectivamente y hasta donde sea necesario seguir diluyendo), $V_2 = 1.5$ mL, C_1 = concentración a la que se encuentra el extracto. Posteriormente, restar a 1.5 mL, el volumen necesario del extracto y ese será el volumen del diluyente, el cual es la misma sustancia que se utilizó para preparar el extracto o partición.

- Se vertieron en cajas de Petri estériles, se dejaron solidificar, se abrieron cuatro agujeros con campanillas de Durham de 5 mm de diámetro (en forma equidistante) y se incubaron a 36°C durante 24 h para chequear esterilidad.
- Se guardaron en refrigeración hasta el momento de su uso.
- Se inocularon 30 μ L de la suspensión de esporas en los agujeros del agar-planta. Se incubaron a 27°C por 14 días.
- Se utilizó como control negativo de actividad antifúngica, 13.5 mL de Agar Sabouraud mezclado con 1.5 mL de alcohol al 70%.

8.3.4.2.8 Lectura e interpretación de resultados

- Se determinó la CIM, observando en qué concentración del extracto se inhibe el crecimiento del hongo.

8.3.4.3 Actividad larvícida (Re, et al., 1999)

8.3.4.3.1 Cultivo de larvas de *S. aegypti* y *A. albimanus*

- Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL de agua del chorro y se dejó reposar por 48 h.
- Se agregaron aproximadamente 40 mg de huevecillos de *S. aegypti* y *A. albimanus*.
- Se incubó por 24 h a temperatura ambiente.

8.3.4.3.2 Determinación de la actividad larvícida

- En la balanza analítica se pesó 1 mg del extracto a ensayar y se disolvió en 1 mL de agua de chorro reposada. Se disolvió completamente con un vórtex.
- En la microplaca, se agregaron por triplicado (en tres pozos diferentes) 100 μ L del extracto disuelto y 100 μ L de agua de chorro reposada con 10-15 larvas.
- Se incubaron a temperatura ambiente (25-28°C) en un lugar oscuro durante 24 h.
- Se contaron en el estereoscopio o microscopio el número de larvas muertas y se determinó la CL₁₀₀ (concentración letal al 100%).
- Se utilizó como control negativo de actividad larvícida, un pozo con 100 μ L de agua de chorro reposada, con 10-15 larvas.
- Se utilizó como control positivo de actividad larvícida, un pozo con 100 μ L de diluciones de larvícida temephos® (Anexos, fotografía 13).

8.3.4.3.3 Lectura e interpretación de resultados

- La prueba de tamizaje es positiva si todas las larvas están muertas.
- Si el porcentaje de larvas muertas es del 100% calcular la CL₁₀₀, para ello repetir la prueba utilizando dosis de 0.5, 0.15 y 0.124 mg/mL.

8.4 Diseño de la investigación

8.4.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental de tipo descriptivo

8.4.2 Variables

Independiente: particiones del extracto etanólico de las cuatro especies de *Piper*.

Dependiente: actividad biocida y antioxidante in vitro de las particiones del extracto etanólico de las cuatro especies de *Piper*.

8.5 Análisis estadístico

Se realizó un estudio en el cual se determinó la actividad biocida (antimicrobiana, larvicida y antifúngica) y antioxidante de las particiones de los extractos de las cuatro especies de *Piper*.

8.5.1 Actividad antioxidante

Se realizaron tres réplicas por conveniencia de cada partición del extracto etanólico y de los estándares de los siguientes ensayos: Determinación de la actividad antioxidante por DPPH, ABTS y fenoles totales. Se calcularon las medidas de tendencia central: media; y medidas de dispersión: desviación estándar. Se calculó la concentración de inhibición al 50% (CI₅₀) por medio de regresión lineal de la actividad antioxidante por DPPH. Se comparó la capacidad antioxidante equivalente de trólox de cada partición del extracto para hacer un análisis de forma descriptiva.

8.5.2 Actividad antimicrobiana

El diseño del estudio fue de bloques completos al azar. Se realizó totalmente al azar con cuatro replicas, se tomaron como tratamientos los extractos de las plantas, posteriormente se determinó la CIM. El orden de las estrías fue al azar, para los microorganismos seleccionados *S. aureus*, *S. typhi*, *M. smegmatis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. neoformans* y *E. coli*. El análisis de resultados se realizó por medio de la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia $\alpha = 0.10$, para concluir que el extracto tiene efecto debe haber inhibición en las cuatro réplicas.

8.5.3 Actividad antifúngica

El diseño del estudio fue de bloques incompletos al azar. Se realizaron cuatro replicas, se tomó como tratamiento los extractos de las plantas. El análisis de resultados se realizó por medio de la prueba de hipótesis binomial, con un nivel de significancia $\alpha = 0.10$, para concluir que el extracto tiene efecto debe haber inhibición en las cuatro réplicas.

8.5.4 Actividad larvicida

El diseño del estudio fue cuantal. El análisis se realizó determinando la CL_{100} (concentración letal al 100%), por medio de regresión no lineal por transformación probit, con un intervalo de confianza del 95%. La prueba de tamizaje se tomó como positiva si todas las larvas se hallaban muertas.

9. RESULTADOS

9.1 Preparación de extractos

Basados en estudios preliminares con especies del género *Piper* que presentaron actividad biocida y antioxidante (Cruz, et al., 2005c; Véliz, et al., 2006) se eligieron cuatro especies (*P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*) para su análisis. El material vegetal fue colectado en La Ecoparcela “El Kakawatal” Samayac, Suchitepéquez, ubicada a 14°33’07.9” latitud norte y a 91°28’00.4” longitud oeste, a una altura de 480 msnm.

El mayor rendimiento se obtuvo en el extracto etanólico de *P. patulum* (30.78%). De las particiones líquido líquido (hexano, acetato de etilo y etanol) los mejores rendimientos se obtuvieron en etanol para *P. patulum* (60.60%) y en acetato de etilo para *P. auritum* (35.4%), *P. jacquemontianum* (20.0 %) y *P. oradendron* (8.2%) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimiento de extractos y sus particiones

Especie	Extracto/Partición	Disolvente	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	89.10	44.60
	Partición	Hexano	2.00	5.00
	Partición	Acetato de etilo	14.20	35.40
	Partición	Etanol	7.60	18.90
<i>P. jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	49.21	24.00
	Partición	Hexano	4.90	16.33
	Partición	Acetato de etilo	6.00	20.00
	Partición	Etanol	5.60	18.50
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	54.69	27.34
	Partición	Hexano	2.00	4.90
	Partición	Acetato de etilo	3.30	8.20
	Partición	Etanol	16.80	42.00
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	61.56	30.78
	Partición	Hexano	2.90	7.30
	Partición	Acetato de etilo	3.00	7.50
	Partición	Etanol	24.30	60.60

Fuente: Datos experimentales.

9.2 Actividad antioxidante

9.2.1 Determinación de la actividad por CCF (revelador DPPH)

Para demostrar la actividad antioxidante, previo a realizar los métodos cuantitativos, se utilizó el método cualitativo por medio de la CCF con revelador de DPPH; así mismo, se

analizaron cuatro estándares TBHQ, β -caroteno, quercitina y rutina, los cuales se utilizaron para comparar los resultados de cada uno de los extractos y sus respectivas particiones (Anexos, fotografía 7).

Todos los extractos y sus particiones presentaron actividad antioxidante, en la mayoría de los casos mejor que el estándar de β -caroteno (Cuadro 2).

Cuadro 2. Actividad antioxidante demostrada por CCF con revelador DPPH

Especie	Extracto/Partición	Disolvente	Actividad antioxidante	Resultado
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	++	Positivo
	Partición	Hexano	+	Positivo
	Partición	Acetato de etilo	++	Positivo
	Partición	Etanol	+	Positivo
<i>P. Jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	++	Positivo
	Partición	Hexano	+	Positivo
	Partición	Acetato de etilo	+++	Positivo
	Partición	Etanol	++	Positivo
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	++	Positivo
	Partición	Hexano	+	Positivo
	Partición	Acetato de etilo	++++	Positivo
	Partición	Etanol	++	Positivo
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	++++	Positivo
	Partición	Hexano	++	Positivo
	Partición	Acetato de etilo	++++	Positivo
	Partición	Etanol	++++	Positivo
TBHQ			+++	Positivo
β -Caroteno	Estándares		+	Positivo
Quercitina			+++	Positivo
Rutina			+++	Positivo

Fuente: Datos experimentales; TBHQ: Terbutilhidroquinona

9.2.2 Determinación de la actividad por el reactivo de DPPH

Los extractos fueron evaluados por el método macrocolorimétrico cuantitativo de reducción del DPPH, a una longitud de onda de 517 nm; así mismo, se analizaron los estándares quercitina, rutina, TBHQ, vitamina C y vitamina E, los cuales se utilizaron para comparar los resultados de cada uno de los extractos y sus respectivas particiones (Anexos, fotografía 8).

En el Cuadro 3, el extracto etanólico de *P. patulum* fue el que presentó mayor actividad antioxidante (CI_{50} 1.56 ± 0.0332 mg/mL); aunque dos de sus particiones demostraron mayor actividad, la partición en acetato de etilo (CI_{50} 1.06 ± 0.0231 mg/mL),

siendo mejor que TBHQ y vitamina E y la partición en etanol (CI_{50} 1.50 ± 0.0363 mg/mL), siendo mejor que vitamina E.

El extracto etanólico de *P. jacquemontianum* presentó una actividad antioxidante moderada (CI_{50} 3.53 ± 0.1392 mg/mL); de sus particiones, la partición en etanol demostró similar actividad (CI_{50} 3.45 ± 0.2108 mg/mL).

El extracto etanólico de *P. oradendron* presentó una actividad antioxidante baja (CI_{50} 8.32 ± 0.0325 mg/mL); aunque dos de sus particiones demostraron mayor actividad, la partición en acetato de etilo (CI_{50} 2.41 ± 0.0232 mg/mL), siendo mejor que vitamina E y la partición en etanol (CI_{50} 6.08 ± 0.0144 mg/mL).

El extracto etanólico de *P. auritum* presentó una actividad antioxidante baja (CI_{50} 11.42 ± 0.5363 mg/mL); aunque de sus particiones, la hexánica demostró mayor actividad (CI_{50} 8.83 ± 0.1633 mg/mL).

Cuadro 3. Actividad antioxidante demostrada mediante la reducción de DPPH macrocolorimétrico (517 nm)

Especie	Extracto/ Partición	Disolvente	Concentración mg/mL	Inhibición (%)	CI_{50} mg/mL
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	16	68.50	11.42 ± 0.1575
	Partición	Hexano	12	68.86	8.83 ± 0.0718
	Partición	Acetato de etilo	16	66.87	12.21 ± 0.0211
<i>P. jacquemontianum</i>	Partición	Etanol	>20	43.14	22.28 ± 0.2385
	Extracto	Etanol	5	63.51	3.53 ± 0.0226
	Partición	Hexano	10	63.22	8.53 ± 0.05797
	Partición	Acetato de etilo	5	65.31	3.83 ± 0.0321
<i>P. oradendron</i>	Partición	Etanol	5	60.62	3.45 ± 0.0115
	Extracto	Etanol	10	63.27	8.32 ± 0.0651
	Partición	Hexano	16	67.57	8.63 ± 0.0894
	Partición	Acetato de etilo	3.2	64.02	$2.41 \pm 0.0453^*$
<i>P. patulum</i>	Partición	Etanol	7	60.06	6.08 ± 0.0711
	Extracto	Etanol	2	69.59	$1.56 \pm 0.3169^*$
	Partición	Hexano	8	61.15	6.97 ± 0.1132
	Partición	Acetato de etilo	1.4	64.55	$1.06 \pm 0.0876^{**}$
Estándares	Partición	Etanol	2	70.20	$1.50 \pm 0.1324^*$
	Quercitina		0.8	63.64	0.64 ± 0.0016
	Rutina		0.16	71.02	0.03 ± 0.0040
	TBHQ		1.6	74.74	1.16 ± 0.0060
Vitamina C		0.16	60.82	0.14 ± 0.0009	
Vitamina E		3.6	62.23	2.87 ± 0.0516	

Fuente: Datos experimentales; TBHQ: Terbutilhidroquinona

9.2.3 Determinación de la actividad por el método ABTS

Los extractos fueron evaluados por el método macrocolorimétrico cuantitativo de ABTS, a una longitud de onda de 734 nm; así mismo, se analizaron seis estándares trólox, quercitina, rutina, TBHQ, vitamina C y vitamina E, los cuales se utilizaron para comparar los resultados de cada uno de los extractos y sus respectivas particiones, y se calcularon los equivalentes de trólox (Anexos, fotografía 9).

En el Cuadro 4, el extracto etanólico de *P. patulum* fue el que presentó mayor actividad antioxidante (CI_{50} 1.98 ± 0.06 mg/mL, equivalente a 2.19 μ mol/mg de trólox); aunque dos de las particiones demostraron mayor actividad, la partición en acetato de etilo (CI_{50} 1.59 ± 0.01 mg/mL, equivalente a 3.23 μ mol/mg de trólox) y la partición en etanol (CI_{50} 1.82 ± 0.05 mg/mL, equivalente a 1.98 μ mol/mg de trólox).

El extracto etanólico de *P. jacquemontianum* presentó una actividad antioxidante intermedia (CI_{50} 4.11 ± 0.10 mg/mL, equivalente a 1.28 μ mol/mg de trólox); aunque de las particiones, la partición en acetato de etilo demostró mayor actividad (CI_{50} 3.18 ± 0.06 mg/mL, equivalente a 1.50 μ mol/mg de trólox).

El extracto etanólico de *P. oradendron* presentó una actividad antioxidante baja (CI_{50} 9.22 ± 0.38 mg/mL, equivalente a 0.61 μ mol/mg de trólox); aunque de las particiones, la partición en acetato de etilo demostró mayor actividad (CI_{50} 2.13 ± 0.06 mg/mL, equivalente a 2.18 μ mol/mg de trólox).

El extracto etanólico de *P. auritum* presentó una actividad antioxidante baja (CI_{50} 13.81 ± 0.48 mg/mL, equivalente a 0.51 μ mol/mg de trólox); aunque dos de las particiones demostraron mayor actividad, la partición en hexano (CI_{50} 8.23 ± 0.21 mg/mL, equivalente a 0.81 μ mol/mg de trólox) y la partición en acetato de etilo (CI_{50} 8.67 ± 0.15 mg/mL, equivalente a 0.84 μ mol/mg de trólox).

Si bien, el extracto etanólico de *P. patulum* mostró alguna actividad, en ningún caso fue mejor que cualquiera de los estándares evaluados. Los extractos y particiones estudiadas presentan muy poca actividad antioxidante, en comparación con los estándares.

Cuadro 4. Actividad antioxidante total mediante el reactivo de ABTS de especies de *Piper*, macrocolorimétrico (734 nm)

Especie	Extracto/Partición	Disolvente	Concentración mg/mL	Inhibición (%)	CI ₅₀ mg/mL	Equivalentes de trólox μ mol/mg
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	20	67.58	13.81±0.48	0.51
	Partición	Hexano	12	68.44	8.23±0.21	0.81
	Partición	Acetato de etilo	12	67.46	8.67±0.15	0.84
	Partición	Etanol	>20	55.27	16.88±0.39	0.54
<i>P. Jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	6	66.19	4.11±0.10	1.28
	Partición	Hexano	11	62.77	9.22±0.38	0.92
	Partición	Acetato de etilo	5	66.52	3.18±0.06	1.50
	Partición	Etanol	16	69.66	10.24±0.26	0.66
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	12	62.08	9.22±0.38	0.61
	Partición	Hexano	>20	54.81	17.45±0.83	0.53
	Partición	Acetato de etilo	2.8	64.98	2.13±0.06	2.18
	Partición	Etanol	12	66.05	9.27±0.11	0.66
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	2.4	63.25	1.98±0.06	2.19
	Partición	Hexano	10	68.29	6.62±0.56	0.83
	Partición	Acetato de etilo	2	64.6	1.59±0.01	3.23
	Partición	Etanol	2.8	70.01	1.82±0.05	1.98
Trólox			0.3	68.62	0.26±0.009	-----
Quercitina			0.07	61.64	0.1136±0.001	-----
Rutina	Estándares		0.04	67.79	0.4232±0.002	-----
TBHQ			0.024	60.59	0.1992±0.0016	-----
Vitamina C			0.012	61.13	0.0201±0.0031	-----
Vitamina E			0.021	59.96	0.3846±0.004	-----

Fuente: Datos experimentales; TBHQ: Terbutilhidroquinona

9.2.4 Determinación de la actividad por fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

Se determinó la actividad antioxidante mediante la presencia de fenoles totales según el reactivo de Folin-Ciocalteu por el método macrocolorimétrico, a una longitud de onda de 765 nm.

En el Cuadro 5, el extracto etanólico de *P. patulum* fue el que presentó mayor cantidad de compuestos fenólicos (107.06±1.04 μ g equivalente de ácido gálico/mg). De sus particiones, la partición en hexano y etanol demostraron la mayor cantidad de compuestos fenólicos (77.67±1.15 μ g equivalente de ácido gálico/mg y 77.59±3.40 μ g equivalente de ácido gálico/mg, respectivamente).

El extracto etanólico de *P. Jacquemontianum* presentó una actividad antioxidante, medida por el contenido de fenoles totales, de 104.52±7.80 μ g equivalente de ácido

gálico/mg. En la partición en hexano se encontró mayor cantidad de compuestos fenólicos (110.91 ± 7.40 μg equivalente de ácido gálico/mg).

El extracto etanólico de *P. auritum* presentó una actividad antioxidante, medida por el contenido de fenoles totales, de 23.47 ± 2.06 μg equivalente de ácido gálico/mg. Aunque de las particiones, la partición en etanol demostró mayor cantidad de compuestos fenólicos (33.76 ± 1.01 μg equivalente de ácido gálico/mg).

El extracto etanólico de *P. oradendron* presentó una actividad antioxidante, medida por el contenido de fenoles totales, de 20.31 ± 2.10 μg equivalente de ácido gálico/mg. Aunque de las particiones, la partición en etanol demostró mayor cantidad de compuestos fenólicos (45.11 ± 0.49 μg equivalente de ácido gálico/mg).

Cuadro 5. Actividad antioxidante demostrada por determinación de fenoles totales mediante el reactivo Folin-Ciocalteu, macrocolorimétrico (765 nm)

Especie	Extracto/Partición	Disolvente	μg equivalente de ácido gálico/mg de extracto*
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	23.47 ± 2.06
	Partición	Hexano	21.98 ± 1.40
	Partición	Acetato de etilo	20.55 ± 1.55
	Partición	Etanol	33.76 ± 1.01
<i>P. Jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	104.52 ± 7.80
	Partición	Hexano	110.91 ± 7.40
	Partición	Acetato de etilo	74.07 ± 1.62
	Partición	Etanol	48.45 ± 2.80
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	20.31 ± 2.10
	Partición	Hexano	9.27 ± 0.66
	Partición	Acetato de etilo	4.76 ± 0.29
	Partición	Etanol	45.11 ± 0.49
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	107.06 ± 1.04
	Partición	Hexano	77.67 ± 1.15
	Partición	Acetato de etilo	58.81 ± 3.46
	Partición	Etanol	77.59 ± 3.40

Fuente: Datos experimentales *Media \pm Desviación estándar

9.3 Actividad antimicrobiana

9.3.1 Determinación de la relación dosis-efecto con amoxicilina/ácido clavulánico

Para validar el bioensayo de actividad antibacteriana, se determinó la relación dosis-efecto con amoxicilina/ácido clavulánico, iniciando en una concentración de 6250 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0.0625 $\mu\text{g/mL}$.

9.3.2 Determinación de la relación dosis-efecto con fluconazol

Para validar el bioensayo de actividad contra levaduras, se determinó la relación dosis-efecto con fluconazol; para *C. albicans* se inició en una concentración de 0.01 mg/mL hasta 0.002 mg/mL y para *C. neoformans* se inició en una concentración de 20 µg/mL hasta 4 µg/mL.

9.3.3 Fase de tamizaje de la actividad antimicrobiana de extractos y particiones

En la fase de tamizaje se realizó el ensayo para demostrar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las cuatro especies de *Piper*, y cada una de sus particiones, a una concentración de 1,000 µg/mL, contra bacterias (*S. aureus*, *S. typhi*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *E. coli*), micobacterias (*M. smegmatis*) y levaduras (*C. albicans* y *C. neoformans*). Así mismo, se realizó un control con amoxicilina/ácido clavulánico, el cual se utilizó para comparar los resultados de cada uno de los extractos y sus respectivas particiones.

En el Cuadro 6, de las cuatro especies de *Piper* evaluadas, *P. auritum* presentó actividad antibacteriana en la partición en hexano y acetato de etilo, *P. Jacquemontianum* en el extracto etanólico, partición en hexano y acetato de etilo, *P. oradendron* en la partición en hexano y acetato de etilo, *P. patulum* en el extracto etanólico y la partición en hexano, acetato de etilo y etanol.

El crecimiento de *B. subtilis* fue inhibido por dos especies vegetales: *P. Jacquemontianum*, en el extracto etanólico, partición en hexano y acetato de etilo; *P. patulum*, en la partición en hexano y acetato de etilo, pero no en el extracto etanólico. Las otras dos especies vegetales no mostraron actividad antimicrobiana.

El crecimiento de *C. albicans* fue inhibido por dos especies vegetales: *P. Jacquemontianum*, en el extracto etanólico y partición en acetato de etilo; *P. patulum*, en la partición en acetato de etilo pero no en el extracto etanólico. Las otras dos especies vegetales no mostraron actividad antimicrobiana.

El crecimiento de *C. neoformans* fue inhibido por las cuatro especies vegetales: *P. auritum*, en la partición en acetato de etilo pero no en el extracto etanólico, *P. Jacquemontianum*, en el extracto etanólico, partición en hexano y acetato de etilo; *P.*

oradendron, en la partición en hexano y acetato de etilo, pero no en el extracto etanólico; *P. patulum*, en el extracto etanólico, partición en hexano, acetato de etilo y etanol.

El crecimiento de *E. coli* fue inhibido por tres especies vegetales: *P. auritum* y *P. jacquemontianum*, en la partición en hexano pero no en el extracto etanólico; *P. patulum*, en el extracto etanólico, partición en acetato etilo y etanol. La otra especie vegetal no mostró actividad antimicrobiana.

El crecimiento de *M. smegmatis* fue inhibido por dos especies vegetales: *P. jacquemontianum*, en la partición en acetato de etilo pero no en el extracto etanólico; *P. patulum*, en el extracto etanólico y partición en acetato de etilo. Las otras dos especies vegetales no mostraron actividad antimicrobiana.

El crecimiento de *S. aureus* fue inhibido por una especie vegetal: *P. patulum*, en el extracto etanólico, partición en acetato de etilo y etanol. Las otras tres especies vegetales no mostraron actividad antimicrobiana.

El crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. typhi* no fue inhibido por ninguno de los extractos y particiones.

En la determinación de la relación dosis-efecto con amoxicilina/ácido clavulánico, se estableció la concentración en la cual, dicho antibiótico es efectivo contra *B. subtilis* (CIM 6.25 µg/mL), *E. coli* (CIM 0.625 µg/mL), *M. smegmatis* (CIM 62.5 µg/mL) y *S. aureus* (CIM 6.25 µg/mL); dicho ensayo fue realizado con cuatro de las seis bacterias investigadas, únicamente con las que presentaron inhibición del crecimiento frente a los extractos y/o particiones; por lo que *P. aeruginosa* y *S. typhi* no fueron probadas. Así mismo, en la determinación de la relación dosis-efecto con fluconazol, se estableció la concentración en la cual, dicho antifúngico es efectivo contra *C. albicans* (CIM 8 µg/mL) y *C. neoformans* (CIM 16 µg/mL).

Cuadro 6. Tamizaje de actividad antibacteriana (1000 µg/mL)

Especie	Extracto/Partición	Disolvente	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	-	-	+	*	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	+	*	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i>	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	+	*	+	*	-	-	-	-
	Partición	Hexano	+	*	+	*	+	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	+	*	+	*	+	+	-	-
<i>P. oradendron</i>	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	-	+	*	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	+	*	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	+	*	+	*	+	+	-	+
	Partición	Hexano	+	*	+	*	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	+	*	+	*	+	+	-	+
	Partición	Etanol	-	-	+	*	+	+	-	+

Fuente: Datos experimentales; (+) Actividad positiva, (-) Actividad negativa; A. *B. subtilis*, ATCC 6051; B. *C. albicans*, ATCC 10231; C. *C. neoformans*, Cepa salvaje; D. *E. coli*, ATCC 25922; E. *M. smegmatis*, ATCC 607; F. *P. aeruginosa*, ATCC 27853; G. *S. typhi*, ATCC 14028; H. *S. aureus*, ATCC 25923.

*Actividad significativa (p=0.0625)

9.3.4 Determinación de la CIM

Se realizó la determinación de la CIM de las especies que presentaron actividad antibacteriana en la fase de tamizaje contra los microorganismos evaluados (Cuadro 7).

Contra *B. subtilis* tanto el extracto etanólico como la partición en hexano de *P. jacquemontianum* presentaron la misma actividad (CIM 250 µg/mL), mientras que la partición en acetato de etilo presentó mayor actividad (CIM 125 µg/mL). El extracto etanólico de *P. patulum* presentó una CIM de 500 µg/mL, pero sus particiones con hexano y acetato de etilo presentaron mejor actividad (CIM 62.5 y 250 µg/mL respectivamente).

Contra *C. albicans* tanto el extracto como la partición en acetato de etilo de *P. jacquemontianum*, y la partición en acetato de etilo de *P. patulum* presentaron igual actividad (CIM 1000 µg/mL).

Para *C. neoformans*, la partición con acetato de etilo de *P. auritum*, la partición en hexano y acetato de etilo de *P. oradendron* y el extracto etanólico, la partición en acetato de etilo y etanol de *P. patulum* presentaron la misma actividad (CIM 62.5 µg/mL). El extracto etanólico, la partición en hexano y acetato de etilo de *P. jacquemontianum* presentaron una

CIM de 31.25 µg/mL. La partición en hexano de *P. patulum* presentó la mejor actividad (CIM 15.63 µg/mL).

Con respecto a *E. coli*, la partición en hexano de *P. auritum* y *P. jacquemontianum*, el extracto y partición etanólica de *P. patulum* presentaron la misma actividad (CIM 1000 µg/mL). Sin embargo la partición en acetato de etilo de *P. patulum* presentó mejor actividad (CIM 500 µg/mL).

Contra *M. smegmatis* la partición en etanol presentó una CIM de 1000 µg/mL, el extracto etanólico y la partición en acetato de etilo presentaron igual actividad (CIM 500 µg/mL), sin embargo la partición en acetato de etilo de *P. jacquemontianum* presentó la mejor actividad (CIM 125 µg/mL).

Con *S. aureus* tanto el extracto como las particiones en acetato de etilo y etanol presentaron la misma CIM de 1000 µg/mL.

Cuadro 7. Concentración inhibitoria mínima de actividad antibacteriana

Especie	Extracto/ Partición	Disolvente	A	B	C	D	E	F	G	H
Concentración (µg/mL)										
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	-	-	1000*	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	62.5*	-	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	250*	1000*	31.25*	-	-	-	-	-
	Partición	Hexano	250*	-	31.25*	1000*	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	125*	1000*	31.25*	-	125*	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	-	62.5*	-	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	62.5*	-	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	500*	-	62.5*	1000*	500*	-	-	1000*
	Partición	Hexano	62.5*	-	15.63*	-	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	250*	1000*	62.5*	500*	500*	-	-	1000*
	Partición	Etanol	-	-	62.5*	1000*	1000*	-	-	1000*
Amoxicilina/ácido clavulánico			6.25	-	-	0.625	62.5	-	-	6.25
Fluconazol			-	8	16	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales; A. *B. subtilis*, ATCC 6051; B. *C. albicans*, ATCC 10231; C. *C. neoformans*, Cepa salvaje; D. *E. coli*, ATCC 25922; E. *M. smegmatis*, ATCC 607; F. *P. aeruginosa*, ATCC 27853; G. *S. typhi*, ATCC 14028; H. *S. aureus*, ATCC 25923.

*Actividad significativa (p=0.0625)

9.4 Actividad antifúngica

9.4.1 Determinación de la relación dosis-efecto con fluconazol

Para validar el bioensayo de actividad antifúngica, se determinó la relación dosis-efecto con fluconazol, iniciando en una concentración de 125 µg/mL hasta 25 µg/mL.

9.4.2 Fase de tamizaje de la actividad antifúngica de extractos y particiones

En la fase de tamizaje se realizó el ensayo para demostrar la actividad antifúngica del extracto etanólico de las cuatro especies de *Piper* y cada una de sus particiones, a una concentración de 1000 µg/mL, contra hongos dermatofitos (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) y hongos filamentosos (*A. niger*, *A. flavus* y *A. oryzae*). Así mismo, se realizó un control con fluconazol, el cual se utilizó para comparar los resultados de cada uno de los extractos y sus respectivas particiones (Cuadro 8).

Los extractos y particiones de las cuatro especies de *Piper* presentaron actividad únicamente contra *M. gypsum* y *T. mentagrophytes*.

Cuadro 8. Tamizaje de actividad antifúngica (1000 µg/mL)

Especie	Extracto/Partición	Disolvente	A	B	C	D	E	F	G
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	+	*
	Partición	Hexano	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. Jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Hexano	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	+	*
	Partición	Hexano	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	+	*
	Partición	Hexano	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	+	+	*
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Datos experimentales; (+) Actividad positiva, (-) Actividad negativa; A. *A. flavus*, ATCC 204304; B. *A. niger*, ATCC 9029; C. *A. oryzae*, ATCC 29293; D. *M. canis*, ATCC 36299; E. *M. gypseum*, C 115 2000; F. *T. mentagrophytes* ATCC 9972; G. *T. rubrum* C 113 2000.

*Actividad significativa (p=0.0625)

9.4.3 Determinación de la CIM

Se realizó la determinación de la CIM de las especies que presentaron actividad antifúngica en la fase de tamizaje contra los microorganismos evaluados (Cuadro 9).

Contra *M. gypseum* la partición en hexano de *P. auritum* presentó una CIM de 250 µg/mL, El extracto etanólico de *P. jacquemontianum* presentó una CIM de 125 µg/mL, sin embargo, la partición en hexano presentó mayor actividad (62.5 µg/mL). Solamente la partición en hexano de *P. patulum* presentó actividad (250 µg/mL).

Contra *T. mentagrophytes* el extracto etanólico de *P. auritum* presentó actividad (CIM 1000 µg/mL), siendo superada por la partición en hexano (CIM 62.5 µg/mL). Las particiones en hexano y acetato de etilo de *P. jacquemontianum* presentaron igual actividad (CIM 31.25 µg/mL). La partición en hexano de *P. oradendron* presentó una CIM de 250 µg/mL y el extracto etanólico y la partición de acetato de etilo de 500 µg/mL. También fue susceptible a la partición en hexano (CIM 125 µg/mL); se obtuvo también actividad con la partición en acetato de etilo (500 µg/mL) y el extracto etanólico (CIM 1000 µg/mL).

Cuadro 9. Concentración inhibitoria mínima de actividad antifúngica

Especie	Partición/Extracto	Disolvente	A	B	C	D	E	F	G
			Concentración (µg/mL)						
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	1000*	-
	Partición	Hexano	-	-	-	-	250*	62.5*	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	125*	31.25*	-
	Partición	Hexano	-	-	-	-	62.5*	31.25*	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	250*	31.25*	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	500*	-
	Partición	Hexano	-	-	-	-	250*	250*	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	500*	500*	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-	-	1000*	-
	Partición	Hexano	-	-	-	-	250*	125*	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-	-	500*	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-	-	-	-
Fluconazol			-	-	-	-	75	75	-

Fuente: Datos experimentales

A. *A. flavus*; B. *A. niger*; C. *A. oryzae*; D. *M. canis*; E. *M. gypseum*; F. *T. mentagrophytes*; G. *T. rubrum*.

*Actividad significativa (p=0.0625)

9.5 Actividad larvicida

9.5.1 Determinación de la relación dosis-efecto con temephos®

Para validar el bioensayo de la actividad larvicida, se determinó la relación dosis-efecto con temephos®, iniciando en una concentración de 1000 µg/mL hasta 0.001 µg/mL.

9.5.2 Fase de tamizaje de la actividad larvicida de extractos y particiones

En la fase de tamizaje se realizó el ensayo para demostrar la actividad larvicida del extracto etanólico de las cuatro especies de *Piper* y cada una de sus particiones, a una concentración de 1000 µg/mL, contra larvas de *S. aegypti* y *A. albimanus* en sus cuatro estadios. Así mismo, se realizó un control con temephos®, el cual se utilizó para comparar los resultados de cada uno de los extractos y sus particiones.

9.5.3 Determinación de CL₅₀

Se determinó la CL₅₀ de la actividad larvicida contra larvas de *S. aegypti* y *A. albimanus*, en sus cuatro estadios.

El Cuadro 10 presenta los resultados de la actividad larvicida donde ninguno de los extractos fue activo contra *S. aegypti*, sin embargo, sí se encontró en la partición en hexano de *P. patulum* (los cuatro estadios), *P. auritum* (segundo estadio) y *P. oradendron* (primer estadio).

Ninguno de los extractos etanólicos presentó actividad larvicida contra *A. albimanus*, sin embargo, sí se encontró en la partición en hexano de *P. auritum* y *P. patulum* (los cuatro estadios) y *P. Jacquemontianum* (cuarto estadio), (Cuadro 11).

Cuadro 10. Actividad larvica contra *Stegomyia aegypti*

Especie	Extracto/ Partición	Extracto	Estadio/Concentración (µg/mL) (Intervalo de confianza 95%)			
			Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	440 (400-490)	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i>	Partición	Etanol	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	-	-	-
<i>P. oradendron</i>	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Partición	Hexano	730 (640-840)	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-
	Partición	Hexano	280 (250-330)	590 (530-720)	290 (250-340)	530 (470-630)
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
Temephos®	Partición	Etanol	-	-	-	-
				10 (7.7-13)		

Fuente: Datos experimentales

Cuadro 11. Actividad larvica contra *Anopheles albimanus*

Especie	Extracto/P artición	Extracto	Estadio/Concentración (µg/mL) (Intervalo de confianza 95%)			
			Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4
<i>P. auritum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-
	Partición	Hexano	250 (220-300)	150 (130-180)	480 (410-570)	420 (350-510)
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
<i>P. jacquemontianum</i>	Partición	Etanol	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	-	-	-	-
	Partición	Hexano	-	-	-	490 (420-580)
<i>P. oradendron</i>	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-
	Extracto	Etanol	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Partición	Hexano	-	-	-	-
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
	Partición	Etanol	-	-	-	-
<i>P. patulum</i>	Extracto	Etanol	-	-	-	-
	Partición	Hexano	260 (220-300)	320 (280-370)	820 (710-960)	610 (530-710)
	Partición	Acetato de etilo	-	-	-	-
Temephos®	Partición	Etanol	-	-	-	-
				10 (7.7-13)		

Fuente: Datos experimentales

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De las cuatro especies (*P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum*) se obtuvieron extractos por percolación utilizando como disolvente etanol y se concentró en el equipo de rotaevaporación. De este extracto se realizó fraccionamiento bioguiado utilizando disolventes con diferente gradiente de polaridad (hexano, acetato de etilo y etanol) para posteriormente analizar la actividad biocida y antioxidante.

El mayor rendimiento de los extractos en etanol se encontró en *P. auritum* (44.6%) donde se obtuvo la mayor cantidad de sólidos totales dentro de los cuales se encuentran los metabolitos secundarios. El extracto con el segundo mejor rendimiento fue *P. patulum* (30.78%), seguido por *P. oradendron* (27.34%) y *P. jacquemontianum* (24.60%). El mayor rendimiento de las particiones de *P. auritum* y *P. jacquemontianum* se obtuvo con acetato de etilo (35.4% y 20.0% respectivamente), y respecto a *P. oradendron* y *P. patulum* se obtuvo con etanol (42.0% y 60.6% respectivamente).

Estos hallazgos indican que la mayor cantidad de metabolitos presentes en las especies estudiadas tienen características polares y por ello fueron extraídos con los solventes de etanol y acetato de etilo.

La actividad antioxidante fue evaluada por medio de cuatro métodos (uno cualitativo y tres cuantitativos). El ensayo cualitativo por bioautografía utilizando la prueba de cromatografía en capa fina con revelador de DPPH (Anexos, fotografía 7), evidenció que los extractos y las particiones de las cuatro especies de *Piper* presentaron actividad antioxidante. Los metabolitos responsables de la actividad pueden ser alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceite volátil y cumarinas, para *P. patulum* (Cruz y col., 2008); terpenos, para *P. jacquemontianum* (Cruz y col., 2005c); alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceite volátil y cumarinas, para *P. oradendron* (Cruz y col., 2008 y Martínez 2009) y para *P. auritum*, terpenos, alcaloides y aceites esenciales (Cruz y col., 2008). Estos resultados fueron comparados con cuatro estándares: quercitina, rutina, β -Caroteno y terbutilhidroxiquinona (TBHQ) los cuales se sabe, presentan actividad antioxidante.

Los resultados de la actividad antioxidante por el método de DPPH y ABTS se expresaron en CI_{50} (mg/mL), lo cual indica la concentración que inhibe el 50% de los radicales que participan en la oxidación, para la determinación del CI_{50} se empleó la ecuación de la recta para cada extracto y partición.

En el método de DPPH, se determinó que la mayor actividad antioxidante de los extractos en etanol, para este método, la presentó la especie de *P. patulum* (CI_{50} 1.56 ± 0.3169 mg/mL) comparando con el estándar de vitamina E (CI_{50} 20.87 ± 0.0516 mg/mL). Esta actividad se atribuye a la presencia de los flavonoides que poseen una excelente actividad antioxidante (Araujo & Salas, 2008).

Respecto a las particiones, para *P. oradendron* la mayor actividad antioxidante, comparando con el estándar de vitamina E, la presentó la partición con acetato de etilo (CI_{50} 2.41 ± 0.0453 mg/mL) y para *P. patulum* con etanol (CI_{50} 1.50 ± 0.1324 mg/mL). Respecto a TBHQ y vitamina E la mayor actividad antioxidante la presentó la partición con acetato de etilo (CI_{50} 1.06 ± 0.0876 mg/mL) de *P. patulum*.

Se determinó que en todas las particiones de *P. auritum* conforme aumenta la polaridad, disminuye la actividad antioxidante; para *P. Jacquemontianum* las particiones con acetato de etilo y etanol presentaron la misma actividad antioxidante que el extracto, manteniendo la actividad, por lo tanto no es significativo; las particiones con hexano de *P. Jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. patulum* presentaron una actividad menor que el extracto etanólico, pudiendo inferir que los metabolitos secundarios presentes fueron insolubles en el disolvente. ($p < 0.05$).

En el método de ABTS, la actividad antioxidante de los extractos en etanol, en orden decreciente, fue *P. patulum* (CI_{50} 1.98 ± 0.129 mg/mL), *P. Jacquemontianum* (CI_{50} 4.11 ± 0.1044 mg/mL), *P. oradendron* (CI_{50} 9.22 ± 0.2539 mg/mL) y *P. auritum* (CI_{50} 13.81 ± 0.2630 mg/mL), sin embargo, ninguno obtuvo mejor actividad antioxidante comparando con los siguientes estándares: trólox (CI_{50} 0.182 mg/mL), quercitina (CI_{50} 0.1136 mg/mL), rutina (CI_{50} 0.4232 mg/mL), TBHQ (CI_{50} 0.1992 mg/mL) y vitamina C (CI_{50} 0.0201 mg/mL).

Con base en los resultados obtenidos con la metodología de ABTS se calculó el TEAC (Equivalentes de trólox), medida de la actividad antioxidante efectiva de cada

extracto a analizar, por lo tanto, a mayor TEAC mayor actividad antioxidante del extracto. Se concluyó que ningún extracto presentó actividad significativa (Whiteman, & Guan, 2002).

En la cuantificación de fenoles se puede observar que la mayor cantidad de compuestos aromáticos se presentaron en los extractos con etanol de *P. patulum* (107.06 ± 1.04 μg ácido gálico/mg) y *P. jacquemontianum* (104.52 ± 7.80 μg equivalentes de ácido gálico/mg) seguido por el extracto de *P. auritum* (23.47 ± 2.06 μg equivalentes de ácido gálico/mg) y por último el extracto de *P. oradendron* (20.31 ± 2.10 μg equivalentes de ácido gálico/mg).

En cuanto a las particiones, la mayor cantidad de compuestos fenólicos para *P. auritum* se encontró en la partición con etanol (33.76 ± 1.01 μg equivalentes de ácido gálico/mg), para *P. jacquemontianum* con hexano (110.91 ± 7.40 μg equivalentes de ácido gálico/mg), para *P. oradendron* con etanol (45.11 ± 0.49 μg equivalentes de ácido gálico/mg) y para *P. patulum* con hexano (77.67 ± 1.15 μg equivalentes de ácido gálico/mg).

Se determinó que en el caso de *P. jacquemontianum* conforme aumenta la polaridad, disminuyen los compuestos fenólicos; en *P. auritum* y *P. oradendron* se observó un efecto de purificación o concentración, ya que en la partición con etanol se observó mayor cantidad de compuestos fenólicos que en el extracto con etanol; *P. patulum* no presentó significancia estadística, de acuerdo a la polaridad del disolvente, ya que se encontraron valores similares en el disolvente más apolar y el más polar (Cuadro 5). ($p < 0.05$).

Respecto a *P. auritum*, García y Colaboradores (2007) demostraron que la actividad antioxidante fue muy baja en relación con vitamina E y no presentó compuestos fenólicos; confirmando así los resultados obtenidos en esta investigación con el extracto con etanol y sus particiones.

En la actividad biocida se observó que en *P. auritum* y *P. oredendron* se encontró actividad en sus particiones, sin encontrarla en el extracto total; así mismo se encontraron particiones en *P. patulum* y *P. jaquemontianum* que presentaron mayor o igual actividad que los extractos en etanol. Se debe tomar en cuenta que la actividad de los compuestos puede variar de acuerdo al disolvente utilizado.

Los bioensayos donde no se encontró actividad en los extractos en etanol, pero sí en sus respectivas particiones, fueron los siguientes: la partición con acetato de etilo de *P. auritum* contra *C. neoformans* y la partición con hexano contra *E. coli* y *M. gypsum*. La partición con hexano de *P. Jacquemontianum* contra *E. coli* y la partición con acetato de etilo contra *M. smegmatis*. La partición con hexano y acetato de etilo de *P. oradendron* contra *C. neoformans* y la partición con hexano contra *M. gypsum*. La partición con acetato de etilo de *P. patulum* contra *C. albicans*, y la partición con hexano contra *M. gypsum* ($p=0.0625$). Los diferentes metabolitos que las especies de *Piper* poseen pueden crear un efecto antagónico, estas moléculas al separarse por el gradiente de polaridad de los solventes pueden potenciar el efecto de su actividad.

Las particiones que presentaron mayor actividad que los extractos en etanol, fueron la partición con hexano de *P. auritum* contra *T. mentagrophytes*; la partición con acetato de etilo de *P. Jacquemontianum* contra *B. subtilis* y la partición con hexano contra *M. gypsum*; la partición con hexano de *P. oradendron* contra *T. mentagrophytes*; la partición con hexano de *P. patulum* contra *B. subtilis*, *C. neoformans* y *T. mentagrophytes*; y la partición con acetato de etilo contra *E. coli* ($p=0.0625$).

Las particiones que presentaron la misma actividad que los extractos en etanol, fueron las siguientes: la partición con acetato de etilo de *P. Jacquemontianum* contra *C. albicans* y la partición con hexano y acetato de etilo contra *C. neoformans* y *T. mentagrophytes*. La partición con acetato de etilo de *P. patulum* contra *M. smegmatis*; y la partición con acetato de etilo y etanol contra *S. aureus* ($p=0.0625$). La actividad presentada por las particiones no cuenta con significancia estadística ya que no se puede establecer las características polares de las moléculas que le otorgan dicha actividad a la especie, esto debido a que el metabolito o metabolitos responsables de la actividad en el extracto etanólico poseen la misma polaridad que el solvente de la partición.

La actividad antibacteriana de *P. oradendron* se puede atribuir a la presencia de quinonas, específicamente las antraquinonas que poseen actividad bacteriostática sobre *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, y actividad antibacteriana sobre *P. pseudomalliae*. La actividad de *P. oradendron* y *P. patulum* se atribuye a los flavonoides, cumarinas, que poseen actividad antibacteriana y antifúngica, así como actividad bacteriostática (Araujo, & Salas, 2008).

Según Danelutte y colaboradores (2003), Martins y colaboradores (2000) y Orjala y colaboradores (1993), estudios químicos realizados en especies de la familia *Piperaceae* del Brasil han revelado la presencia de diversos productos naturales con un amplio espectro de actividades biológicas, dentro de las que se encuentran alcaloides, amidas, pironas, dihidrochalconas, flavonoides, fenilpropanoides, lignanos y neolignanos. Alécio (1988), Navickiene (2000) y Silva (2009) determinaron varias amidas isobutílicas, pirrolidina, dihidroxipiridona y piperidina, las cuales han generado interés debido a sus potentes propiedades antifúngicas.

Koroishi y colaboradores (2008) y Pessini y colaboradores (2005) determinaron que los neolignanos, eupomatenoide-3 y eupomatenoide-5 mostraron una fuerte actividad sobre *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis* y *M. gypseum* y varias especies de *Candida*. Navickiene y colaboradores (2000) reportaron actividad antifúngica de varias amidas como la piplartina, piperamina, piperina, pelitorina, aisladas de semillas y hojas de *P. tuberculatum*.

El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad larvicida contra *S. aegypti* y *A. albimanus* determinó que la partición responsable de dicha actividad es con hexano. De estos, *P. auritum* presentó actividad contra el segundo estadio de *S. aegypti* (CL₅₀ 0.44 mg/mL, IC₉₅ 0.40-0.49 mg/mL) y contra los cuatro estadios larvarios de *A. albimanus*, donde se observó que la mejor DL₅₀ es la del segundo estadio (CL₅₀ 0.15 mg/mL, IC₉₅ 0.13-0.18 mg/mL). Según Parmar (1997), Leyva (2009) y Sánchez (2009) esta actividad se atribuye a la presencia safrol como componente mayoritario de *P. auritum*, el cual actúa como insecticida natural, con acción neurotóxica. *P. jacquemontianum* presentó actividad contra el cuarto estadio de *A. albimanus* (CL₅₀ 0.49 mg/mL, IC₉₅ 0.42-0.58 mg/mL). *P. oradendron* presentó actividad contra el primer estadio de *S. aegypti* (CL₅₀ 0.73 mg/mL, IC₉₅ 0.64-0.84 mg/mL). *P. patulum* presentó actividad contra los cuatro estadios larvarios de las dos especies de insectos estudiadas, donde se observó que la mejor CL₅₀ para *S. aegypti* es la del primer estadio (CL₅₀ 0.28 mg/mL, IC₉₅ 0.25-0.33 mg/mL) al igual que para *A. albimanus* (CL₅₀ 0.26 mg/mL, IC₉₅ 0.22-0.30 mg/mL). Según Araujo & Salas (2008) tanto *P. oradendron* como *P. patulum* presentan saponinas esteroides que han demostrado actividad insecticida. Así mismo, Goretti y colaboradores (2006) determinaron

la presencia de terpenos en el aceite esencial de *P. patulum*, el cual posee actividad insecticida.

Posiblemente la actividad se encuentre en el aceite esencial, ya que las demás particiones y el extracto obtenido mediante disolventes con gradiente de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, etanol) no presentaron actividad larvicida.

Rojas y colaboradores (2010) demostraron que las dos especies de insectos en estudio exhiben mayor resistencia a la dosis de aceite esencial empleada mientras más avanzado es el estadio larvario. Demostró que la actividad larvicida de los aceites esenciales de *P. patulum* presentaron menores concentraciones letales que *P. auritum* contra los cuatro estadios larvarios de *A. albimanus* y *S. aegypti* lo que demuestra la mayor toxicidad de esta especie. En el presente estudio se demuestra lo contrario, ya que la partición con hexano de *P. auritum* presentó menores concentraciones letales que *P. patulum* contra los cuatro estadios larvarios de *A. albimanus*.

11. CONCLUSIONES

11.1 Con el fraccionamiento se estableció que la mayor cantidad de metabolitos presentes en las especies estudiadas tienen características polares y por ello fueron extraídos con etanol en *P. oradendron* y *P. patulum* (42.0% y 60.6% respectivamente) y con acetato de etilo en *P. auritum* y *P. jacquemontianum* (35.4% y 20.0% respectivamente).

11.2 La mejor actividad antioxidante se evidenció en las particiones de la especie *P. patulum* por los métodos cuantitativos de DPPH y ABTS y por la presencia de mayor cantidad de compuestos fenólicos.

11.3 Tanto el extracto con etanol de las hojas de las cuatro especies de *Piper*, como sus particiones obtenidas con disolventes de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo y etanol) presentaron al menos una actividad biocida positiva.

11.4 *P. auritum* presentó actividad contra el segundo estadio de *S. aegypti* y contra los cuatro estadios larvarios de *A. albimanus*; *P. jacquemontianum* presentó la mejor actividad inhibitoria contra *C. neoformans*; *P. oradendron* presentó actividad contra *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*; mientras que, *P. patulum* presentó actividad en casi todo el tamizaje biocida, por lo que es la planta que presenta actividad más completa, dentro del estudio realizado.

12. RECOMENDACIONES

12.1 Realizar el estudio fitoquímico de los extractos y sus particiones de las cuatro especies de *Piper* evaluadas para determinar el metabolito que presenta la actividad biocida y antioxidante; con la finalidad de crear un producto que pueda poseer uso medicinal, aromático y/o cosmético.

12.2 Realizar por fraccionamiento bioguiado a los extractos activos que se desconoce su principio activo, con el fin de identificar la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad.

12.3 Evaluar otras partes de la planta para determinar si presentan actividad biocida y antioxidante y si existe diferencia en cuanto a la composición química.

12.4 Fraccionar los extractos que presentaron actividad para aislar y elucidar la naturaleza química de las moléculas responsables de la bioactividad.

12.5 Realizar un estudio comparativo donde se evalúen los extractos y aceites esenciales de las diferentes partes de la planta para determinar si presentan actividad biocida (antimicrobiana, citotóxica, larvicida) y antioxidante.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alécio, A.C., Bolzani, V., Marx, M.C., Kato, M.J., & Furlan, M. (1988). Antifungal Amide from leaves of *Piper hispidum*. *Journal of Natural Products*, 61, 637-639.
- Araujo, J., & Salas, R. (2008). Actividad antimicrobiana de plantas Sciences of the United States of America. *Revista científica*.
- Benítez, L.P., López, M.I., & Romero, M.E. (2002). *Proyecto de pre-factibilidad técnica y económica del cultivo de pimienta negra en la península de Santa Elena* (Proyecto de graduación). Guayaquil: Escuela superior politécnica del litoral.
- Benítez, N. (2008). Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper* L. (*Piperaceae*). *Revista institucional Universidad Tecnológica de Chocó*, 27, 67-75.
- Bonkanka, C.X. (2009). *Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal*. La Laguna: Universidad de la Laguna.
- Brancato, F.P., & Golding, N.S. (1953). The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. *Mycologia*, 45, 848.
- Burger, W.C. (1971). *Flora Costaricensis, Número 18*. Chicago: Field Museum of Natural History.
- Burlingame, E.M., & Reddish, G.F. (1973). Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 14, 649-653.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., & Maki, J. (1988). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 natives plants. *Journal Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Cáceres, A., López, B., Juárez, X., del Águila, J., & García, S. (1993). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal Ethnopharmacology*, 40, 207-213.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal de Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.

- Cleaves, C. (2001). *Etnobotánica participativa en siete comunidades de la zona de influencia del Parque Nacional Laguna Lachuá, Cobán, Alta Verapaz*. Tesis de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Cruz, S.M., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., Morales, J., et al. (2005a). *Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de Piperaceas*. Tesis de Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Cruz, S.M., Samayoa, M., Cáceres, A., Gaitán, I., Molina, R., & Álvarez, L. (2005b). Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de *Piperaceae*. *Tikalía*, 23, 51-68.
- Cruz, S.M., Solís, G., Vásquez, Y., Calderón, A., Ortega, E., Gupta, M.P., et al. (2005c). Evaluación de la actividad biocida del extracto etanólico y particiones de *P. aeruginosibaccum* Trelease. *Revista Latinoamericana de Química*, 33, 159.
- Cruz, S.M., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., Morales, J., et al. (2008). Caracterización química de los aceites esenciales y extractos de especies mesoamericanas del género *Piper* como nuevos recursos aromáticos. *Revista Científica, Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas*, 4, 25-29.
- CYTED. (1993). *Manual de Técnica de Investigación*. Bogotá: Proyecto X-1.
- Danelutte A.P., Lago J.H., Young M.C., & Kato, M.J. (2003). Antifungal flavonones and prenylated hydroquinones from *Piper crassinervium* Kunth. *Phytochemistry*, 64, 555-559.
- Dias, P.R., Lima, D., Guimarães, E.F., & Coelho, M.A. (2001). Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*, 58, 547-551.
- Duke, J.A., Bogenschutz-Godwin, M.J., & Ottesen, A.R. (2008). *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America*. New York: CRC Press.
- España, S.M., Velez de Marsicovetere, P.V., & Cáceres, A. (1994). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 5. Vibriocidal activity of five American plants used to treat diarrhea. *Fitoterapia*. 65, 273-274.

- Fuentes, B. (2007). *Manual de Laboratorio de Química Orgánica*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- García, A., Leyva, M.A., Martínez, J.R., & Stashenko, E.E. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (*Piperaceae*) difundida en la costa colombiana. *Scientia et Technica*, 13, 439-442.
- Gómez, A.L. (2008). *Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies de Piperaceas (P. Jacquemontianum, P. oradendron y P. umbellatum)*. Tesis de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Goretti, M., Costa, I.C., Dantas, B., Maia, S., & Freitas, S.M. (2006). Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) Larvae. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 48, 211-214.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., et al. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (*Piperaceae*) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27, 39-48.
- Gupta, M.P. (2008). *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Santa Fé de Bogotá: CYTED.
- Hernández, I.L. (2007). *Validación farmacológica del efecto antiinflamatorio, de hoja de Solanum hartwegli Benth (Huiz), de hoja de Litsea guatemalensis Mez (Laurel), y de hoja de Piper Jacquemontianum Kunth (Cordoncillo)*. Tesis Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala.
- House, P.R., Lagos-Witte, S., Ochoa, L., Torres, C., Mejía, T., & Rivas, M. (1995). *Plantas medicinales comunes de Honduras*. Tegucigalpa: UNAH/CIMN-H/CIIR/GTZ.
- Koroishi, A.M., Foss, S.R., Cortez, D.A., Ueda-Nakamura, T., & Dias, B.P. (2008). In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal Ethnopharmacology*, 117, 270-277.

- Lago, J.H., Chen, A., Young, M.C., Guimarães, E., de Oliveira, A., & Kato, M.J. (2009). Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (*Piperaceae*). *Phytochemistry Letters* 2, 96-98.
- Laranjinha, J., Vieira, O., Madeira, V., & Almeida, L. (1995). Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323, 373-381.
- Leyva, M., Marquetti, M., Tacoronte, J.E., Scull, R., Olinka, T., Mesa, A., et al. (2009). Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Revista Biomédica*, 20, 5-13.
- Lock, O. (1994). *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad del Perú.
- López, P., Rojano, B., & Lobo, T. (2007). *Actividad antioxidante en musgos*. Medellín: Universidad Tecnológica de Pereira.
- MacCarthy, P.J., Pitts, T.P., Gunawardana, G.P., Kelly-Borges, M., & Pomponi, S.A. (1992). Antifungal activity of Meridine, a natural product from the marine sponge *Corticium* sp. *Journal of Natural Products*, 55, 1644-1668.
- MacRae, W.D., Hudson, J.B., & Towers, G.H. (1988). Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal Ethnopharmacology*, 22, 143-172.
- Martínez, J.V. (2009). *Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de 3 especies de Piper (Piper jacquemontianum, Piper donnell smithii y Piper oradendron) con fines de conservación y mejoramiento para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala*. (Proyecto FODECYT No. 114-2006). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Martins, R.C., Latorre, L.R., Sartorelli, P., & Kato, M.J. (2000). Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* 55, 843-846.
- Mitscher, L.A., Leu, R.P., Bathala, M.S., Wu, W.N., & Beal, J.L. (1972). Antimicrobial agents from higher plants. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, 35, 157-166.

- Mitscher, L.A., Drake, S., Gollapudi, S.R., & Okwute, S.K. (1987). A modern look at folkloric use of Anti-infective agents. *Journal of Natural Products*, 5, 1025-1041.
- Morton, J.F. (1981). *Atlas of Medicinal plants of Middle America: Bahamas to Yucatan*. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publisher Ltd.
- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., & Méndez, J.J. (2007). Potencial Antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información tecnológica*, 18, 65-74.
- Navickiene H.M.D., Alécio A.C., Kato M.J., Bolzani, V da S., Young M.C.M., Cavalheiro A.J., et al. (2000). Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, 55, 621-626.
- Okunade, A.L, Hufford, C.D., Clark, A.M., & Lentz, D. (1997). Antimicrobial Properties of the Constituents of *Piper aduncum*. *Phytotherapy Research*, 11, 142-144.
- Orjala, J., Wright, A.D., Rali, T., & Sticher, O. (1993). Aduncamide, a cytotoxic and antibacterial beta-phenylethylamine-derived amide from *Piper aduncum*. *Natural Product Letters*, 2, 231-236.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., et al. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, 46, 597-673.
- Pessini, G.L., Dias Filho, B.P., Vataru, C., & Garcia D.A. (2005). Antifungal activity of the extracts and neolignan from *Piper regnelli* (Miq.) C.D.C. var. *pallescens* (C.D.C) Yunck. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1130-1133.
- Phipps, S.M., Sharap, M.H.M., & Butterweck, V. (2007). Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum*, 33, 810-814.
- Pietrzyk, D.J., & Frank, C.W. (1983). *Química Analítica*. México: Editorial Técnica.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice.Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Repetto, M., & Sanz, P. (1993). *Glosario de términos toxicológicos. IUPAC (Duffs y cols)*. España: Asociación Española de Toxicología.
- Rivero, A., & Betancort, J.R. (2006). *Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas*. Las Palmas de Gran Canaria: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

- Rojas, E.B., García, R.A., & Morales, A.J. (2010). *Actividad de extractos vegetales sobre larvas de insectos de importancia en Entomología Médica*. Seminario de Investigación de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Rojas, M. (2009). *Tratado de medicina tradicional mexicana*. Tomo II: Bases teóricas, clínica y terapéutica. México: Tlahui.
- Sáez, J., Granados, H., Escobar, G., Cardona, W., Atehortúa, L., Callejas, R., et al. (1998). Piperlonguminina y estigmasterol, compuesto de raíces y tallos de *Piper auritum*, Actividad insecticida de extractos. *Revista Colombiana de Química*, 27, 77.
- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T.M., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). Estudio Químico y Microbiológico del Aceite Esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de Anís). *Revista de Protección Vegetal*, 24, 39-46.
- Silva, W.C., De Souza, J.R., Menezes, H.E., Heinzen, H., Cesio, M.V., Mato, M., et al. (2009). Toxicity of *Piper aduncum* L. (Piperales: Piperaceae) from the Amazon forest or the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 164, 267-274.
- Soberón, G.V., Rojas, C., Saavedra, J., Kato, M.J., & Delgado, E. (2006). Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). *Revista Peruana de Biología*, 13, 21-32.
- Standley, P., & Steyermark, J. (1952). *Flora of Guatemala*. Chicago: Fieldiana: Botany, 24(3), 275-337, 283-313.
- Stevens, W.D., Ulloa, C., Pool, A., & Montiel, O.M. (2001). *Flora de Nicaragua*. Missouri: Missouri Botanical Garden Press.
- Tebbs, M.C. (1993). Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 3. The taxonomy of *Piper* sections *Lepianthes* and *Radula*. *Bulletin of the Natural History Museum London*, 23, 1-50.
- Torres, J., & García, A. (2001). Alcamidas en plantas: distribución e importancia. *Avance y Perspectiva*, 20, 377-387.
- Trease, E. (1991). *Trease y Evans, Farmacognosia*. Madrid: Editorial Interamericana MacGraw-Hill.

- Vanbreuseghem, R., De Vroey, C., & Takashio, M. (1969). Production of macroconidia by *Microsporium ferrugineum* OTA 1922. *Sabouraudia*, 7, 252-56.
- Vasques, R., Debonisi, H.M., Kato, M.J., Da Silva, V., Méda, C.I., Young, M.C., et al. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 59, 521-527.
- Véliz, R., Cruz, S., Gómez, A., García, V., Alvarez, L., Cáceres, A., et al. (2006). *Caracterización de Aceites Esenciales y extractos de ocho especies Mesoamericanas de Piperaceas y evaluación de la actividad biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales*. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB), Universidad de San Carlos, Guatemala.
- Whiteman, M., & Guan, T.T. (2002). *Antioxidant activities of some tropical fruits*. Department of Biochemistry. Singapore: National University of Singapore.

14. ANEXOS



Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 1. Recolección de la materia prima en la Ecoparcela El Kakawatal



Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 2. Proceso de limpieza y secado de la materia prima



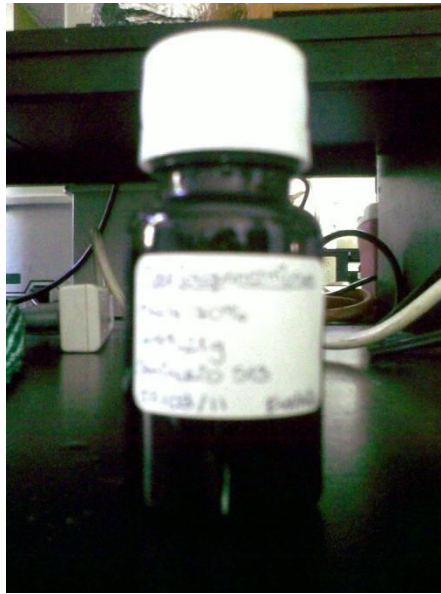
Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 3. Evaluación del porcentaje de rendimiento con etanol al 50, 70 y 95 %



Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 4. Rotavaporación de los extractos y obtención del extracto



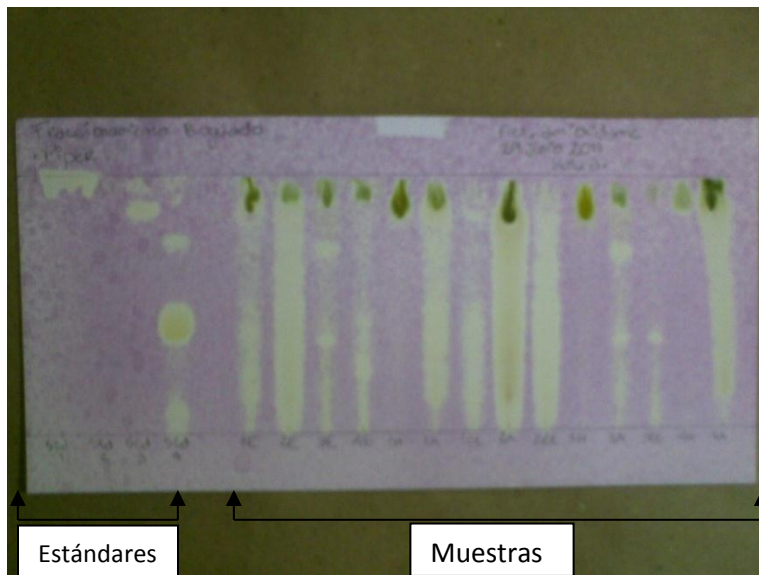
Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 5. Envasado y etiquetado de los extractos



Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 6. Fraccionamiento de los extractos etanólicos por medio de partición líquido-líquido con ampolla de decantación



Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 7. Determinación de actividad antioxidante por cromatografía en capa fina con revelador de DPPH



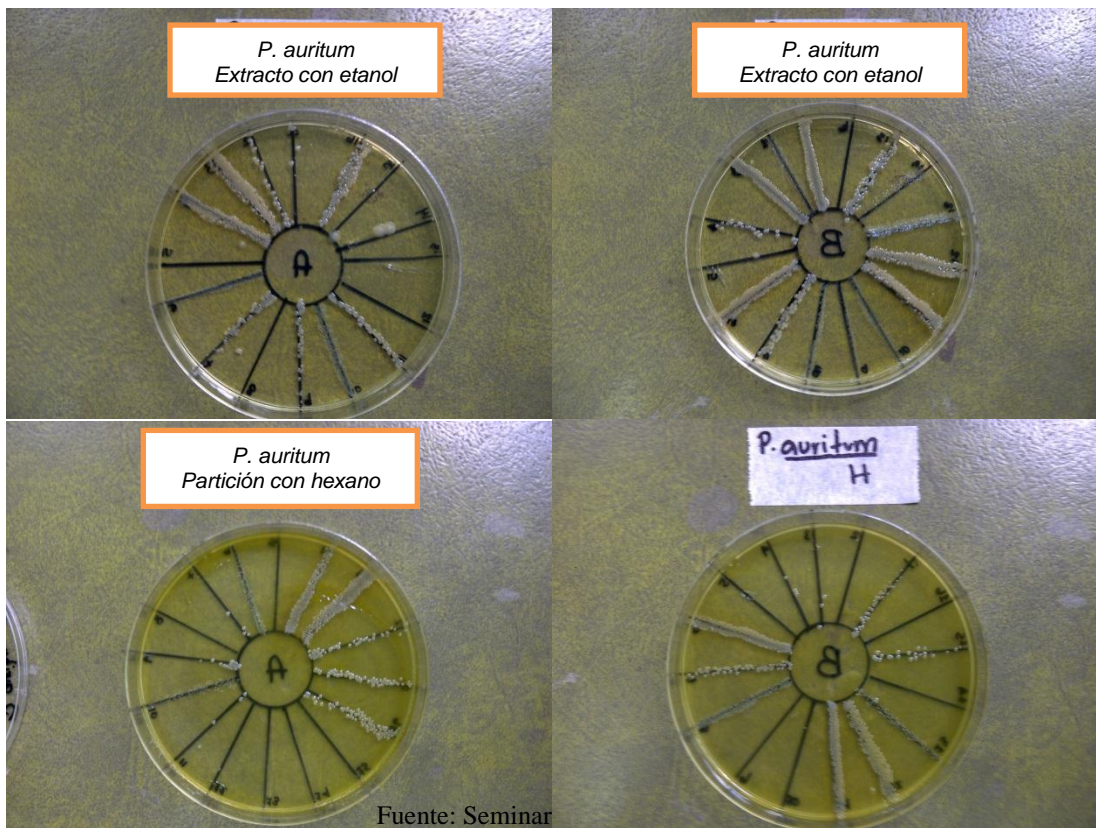
Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 8. Cuantificación de actividad antioxidante por método de DPPH



Fuente: Seminario S 13-10

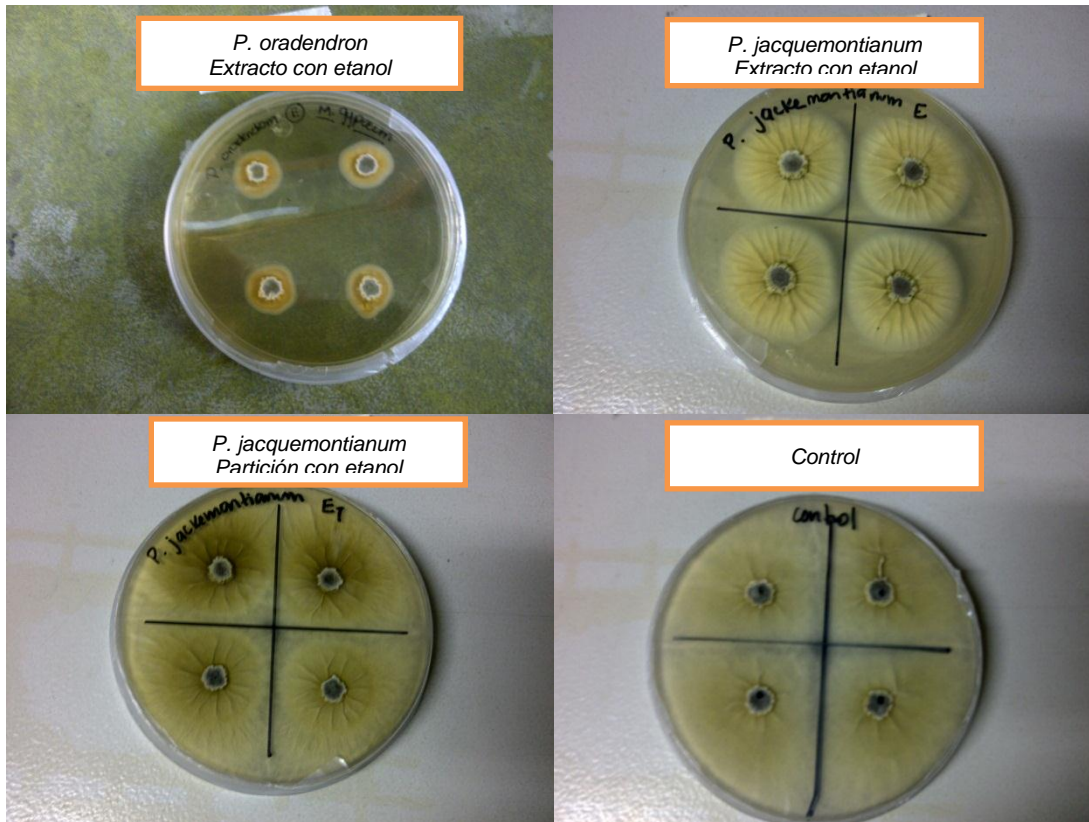
Fotografía 9. Cuantificación de actividad antioxidante por método de ABTS



Fuente: Seminar

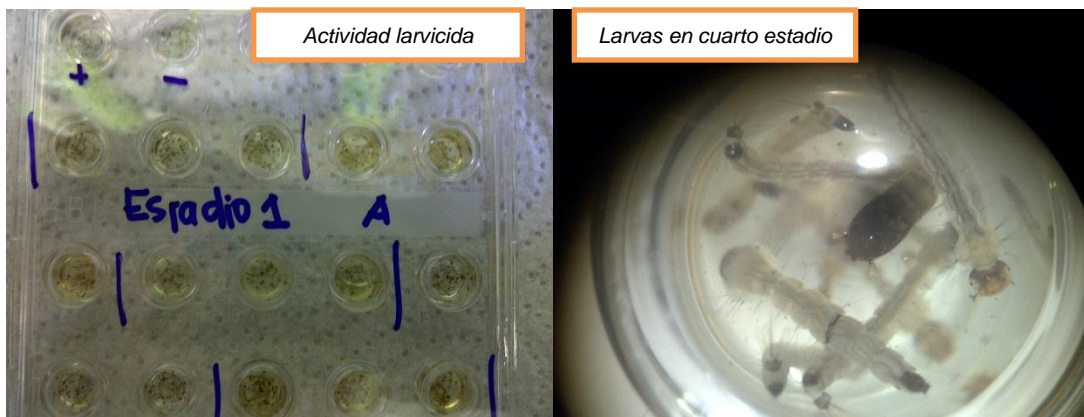
Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 10. Fase de tamizaje de la actividad antimicrobiana



Fuente: Seminario S 13-10

Figura 12. Fase de tamizaje de la actividad antifúngica



Fuente: Seminario S 13-10

Fotografía 13. Actividad larvicida