

Actividad Antibacteriana y Citotoxicidad de Cinco Especies Vegetales de la Zona Altoandina y Amazónica de la Región del Cusco

Antibacterial Activity and Cytotoxicity of Five Plant Species from the High Andean and Amazonian Zones of the Cusco Region

Recibido: 19 de Noviembre del 2021 | Aceptado: 30 de Diciembre del 2021

Vera-Ferchau Karina¹, Villena-Tejada Magaly¹, Vera-Ferchau Ingrid¹ & Cardona-Rivero Anahí¹

¹*Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC).*

*Correo electrónico: karina.vera@unsaac.edu.pe, magaly.villena@unsaac.edu.pe, ingrid.vera@unsaac.edu.pe, anahi.cardona@unsaac.edu.pe.

Resumen

La presente investigación, tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana y citotoxicidad de las especies *Acicarpha tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca), *Gamochaeta spicata* (Queto-Queto), *Minthostachys glabrescens* (Benth) Epling (Muña), *Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endlicher (Mullaca) y *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) de la zona altoandina y amazónica de la región del Cusco, Perú. Se desarrolló una investigación descriptiva, no experimental y transversal. Se prepararon extractos etanólicos mediante el método de maceración. La actividad antibacteriana, se determinó por medio de la concentración mínima inhibitoria (CMI), empleándose el método de macro dilución en medio líquido y cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus pneumoniae* 49619 y *Salmonella typhimurium* 14028. Para determinar el grado de toxicidad se utilizó el ensayo de *Artemia salina*. Los resultados de la actividad antibacteriana mostraron que el Queto-Queto y la Mullaca tienen efecto frente a *S.aureus*, *E. coli* y *S.pneumoniae*, Mientras que, el Matico actúa frente a *S.pneumoniae* y *S.aureus*. En el caso de la Estrella Kisca y Muña dieron positivo frente a *S.typhimurium* y *E.coli*. La prueba de citotoxicidad con *Artemia salina*, demostró que, los extractos de Estrella Kisca y Queto – Queto son muy tóxicos con una CL₅₀ de 19.639 y 58.104 respectivamente. Por otro lado, los extractos considerados moderadamente tóxicos son los de Muña, Mullaca y Matico con CL₅₀ de 100.092, 415.451 y 158.006 respectivamente. Se llegó a la conclusión que todos los extractos etanólicos tienen actividad antibacteriana y presentan diferente grado de toxicidad.

Palabras clave: Acicarpa tribuloides, Gamochaeta spicata, Minthostachys glabrescens, Muehlenbeckia volcanica, Piper elongatum, Artemia salina, citotoxicidad, actividad antibacteriana.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the antibacterial activity and cytotoxicity of the species *Acicarpa tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca), *Gamochaeta spicata* (Queto-Queto), *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling (Muña), *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham) Endlicher (Mullaca) and *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) from the high Andean and Amazonian zones of the Cusco region, Peru. A descriptive, non-experimental and cross-sectional research was carried out. Ethanolic extracts were prepared by the maceration method. The antibacterial activity was determined by means of the minimum inhibitory concentration (MIC), using the macro dilution method in liquid medium and ATCC strains of *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus pneumoniae* 49619 and *Salmonella typhimurium* 14028. The *Artemia salina* assay was used to determine the degree of toxicity. The results of the antibacterial activity showed that Queto-Queto and Mullaca have effect against *S.aureus*, *E. coli* and *S.pneumoniae*; while, Matico acts against *S.pneumoniae* and *S.aureus*. In the case of Estrella Kisca and Muña, they were positive against *S.typhimurium* and *E.coli*. The cytotoxicity test with *Artemia salina* showed that the extracts of Estrella Kisca and Queto - Queto are very toxic with an LC₅₀ of 19,639 and 58,104 respectively. On the other hand, the extracts considered moderately toxic are those of Muña, Mullaca and Matico with LC₅₀ of 100,092 ; 415,451 and 158,006 respectively. It was concluded that all ethanolic extracts have antibacterial activity and have different degree of toxicity.

Key words: Acicarpa tribuloides, Gamochaeta spicata, Minthostachys glabrescens, Muehlenbeckia volcanica, Piper elongatum, Artemia salina, cytotoxicity, antibacterial activity.

Introducción

En los últimos años el uso de plantas medicinales se ha visto incrementado en gran medida (Aguirre et al., 2016). Es así, que en la región Cusco existe una alta riqueza de plantas medicinales comercializadas en los mercados y cuyos conocimientos ancestrales están arraigados en la cultura quechua, de las cuales 83% son especies nativas y un 78% proceden de localidades aledañas a la región andina (Huamantupa et al.,2011).

La flora representa un 10% del total mundial, del cual un 30% es endémico. El Perú es el quinto país en el mundo en número de plantas conocidas y usadas por la

población; y es el primero en especies domesticadas nativas (182 especies) (Brack, 1999). Bajo esa premisa, el estado peruano a través de EsSalud, promueve el uso de las plantas medicinales como alternativa o medicina complementaria.

Según la Organización Mundial de la Salud (2002), para el futuro, la información fidedigna en cuanto al uso apropiado de productos y terapias será el reto más importante para la Medicina Tradicional/Medicina Alternativa- Complementaria. La transculturación había resultado en una pérdida grande del conocimiento tradicional de plantas silvestres de gran valor para la ciencia y la tecnología del país (Brack, 1999). En vista, que la identificación y los valores nacionales son reafirmados por el conocimiento vegetal de todos los grupos étnicos de Perú, es de gran importancia que no se pierdan por la modernización y globalización (Bussmann, R. W., & Sharon, D., 2016).

En ese sentido, el desarrollo de la moderna investigación farmacológica va dirigido al estudio de las propiedades de plantas medicinales; precisamente la perspectiva más inmediata que se entrelaza dentro de una visión integral que facilite el desarrollo de una agenda para el adecuado uso de plantas medicinales es la investigación de sus propiedades y posteriormente las posibilidades de desarrollo de fitofármacos (Salaverry, 2005).

En nuestra región son escasos los reportes de investigaciones sobre medicina tradicional y etnobotánica, razón por la cual el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana y citotoxicidad de cinco especies vegetales de la zona altoandina y amazónica de la región del Cusco.

Material y métodos

Recolección y Preparación de las Muestras Vegetales

Se trabajó con las hojas de cinco especies vegetales de la región del Cusco como son *Acicarpha tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca) recolectada en provincia el distrito de Santiago, localidad Occopata-Ancaschaca, altitud 3922 msnm y coordenadas UTM-19L-175987-8494223, *Gamochaeta spicata* (Queto-Queto) recolectada en la provincia del Cusco, distrito Santiago, localidad Occopata-Ancaschaca altitud 3950 msnm, coordenadas UTM-19L-175987-8494236; *Minthostachys glabrescens* (Benth) Epling (Muña) recolectada en la provincia de Calca, distrito Yucay, localidad alturas de Yucay con coordenadas UTM-19L-189848-8513312; *Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endlicher (Mullaca) recolectada en la provincia de Paruro, distrito Huarquite, localidad Huanca-Huanca, coordenadas UTM-18L-814748-847859 y *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) se recolectó en la provincia de La Convención, distrito Santa Ana, localidad Santa Teresa, altitud 800 msnm, coordenadas UTM-18L-758430-8586152. Los ejemplares fueron identificados en el Herbario Vargas Cuz de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Las muestras se secaron en un secadero de plantas al medio ambiente y en sombra durante 15 días. El material seco se homogenizó utilizando un molino de martillos marca Si-lab modelo MM1.5 con tamaño de partícula 0.5 mm (USP38-NF33, 2015).

Preparación de los Extractos Hidroalcohólicos al 70%

De las muestras obtenidas de la molienda se tomaron 50 gramos de cada una y se colocaron en frascos de vidrio de boca ancha y de color ámbar, luego se agregó 500 mL de etanol de 70° y fueron llevados a maceración a temperatura ambiente por 15 días, agitando manualmente durante 5 minutos dos veces al día. Luego, se filtró el macerado utilizando papel Whatman N° 1 en un matraz estéril, el filtrado fue llevado al evaporador de extractos marca Si-lab, modelo EE80L a 40°C hasta la evaporación total, obteniéndose el extracto seco de cada planta (USP38-NF33, 2015).

Preparación de los Aceites Esenciales

La extracción del aceite esencial de *Minthostachys glabrescens* (Benth) Epling (Muña), se realizó en un destilador por arrastre de vapor de agua marca Si-lab, modelo DAE20L, para lo cual se utilizó 5 kg. de la planta seca.

Procedimiento para el Análisis Fitoquímico Cualitativo

Para la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios se utilizó el tamizaje fitoquímico de Rondina y Coussio (1969), modificado por Alfonso et al. (2000). A una porción de un gramo del extracto seco de cada especie vegetal, se le realizaron reacciones de coloración y/o precipitación con diferentes agentes cromóforos específicos para los siguientes grupos funcionales: flavonoides, compuestos fenólicos, quinonas, resinas, alcaloides, taninos y saponinas. En el análisis cualitativo se utilizó el sistema de cruces (+ poca cantidad, ++ cantidad moderada y +++ abundante cantidad) y se detalló la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios en las muestras. (USP38-NF33, 2015).

Procedimiento para el Análisis Espectrofotométrico UV – Visible

Para el análisis espectrofotométrico, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis doble haz, marca Jenway, modelo 6850. Se preparó una infusión al 10% con agua destilada y posteriormente, se tomó una muestra de 3 mL de la infusión para realizar el análisis en el espectrofotómetro UV VIS en el rango de 190-800 nm. (USP38-NF33, 2015).

Determinación del Efecto Antibacteriano

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) antibacteriana para lo cual se utilizó el método de macro dilución en medio líquido (Granados R. y Villaverde C., 1997; Woods G y Washington J. 1995). Para lo cual se utilizaron cepas de ATCC de *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus pneumoniae* 49619 y *Salmonella typhimurium* 14028, las que fueron conservadas en tubos con 40 mL de agar tripticasa soya en pico de flauta debidamente rotulados, codificados e incubados a 37 °C por 24 horas, para luego conservar a 4 °C y repicar a un nuevo medio cada 15 días para la conservación de la cepa. Luego se procedió a la activación de la cepa, seguidamente se realizó la estandarización de las curvas de crecimiento de las cepas, para lo cual se tomó el inóculo de la muestra de la cepa, se propagó en BHIA (Brain and Heart Infusión Agar) e incubó a 37 °C por 24 horas. Para estandarizar la concentración de la cepa se comparó con una escala de Mac Farland de 0.5 que equivale a 1.5×10^8 UFC/mL.

En el caso de estrella kiska, queto-queto, mullaca, matico se trabajó con los extractos secos etanólicos, para lo cual, se realizaron una serie de diluciones con caldo Muller Hinton en 10 concentraciones de 5.12, 2.56, 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02 y 0.01 mg/mL.

En lo referente a la muña se trabajó con el aceite esencial en concentraciones porcentuales de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.095 %. En tubos con tapón rosca, se colocaron un mililitro de cada solución de extractos y un mililitro de caldo de cultivo estéril. Luego se inoculó con un mililitro de suspensión de las cuatro cepas bacterianas en cada tubo, se incubó por 24 horas a 37 °C. Luego se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Determinación de la Citotoxicidad con Artemia salina

El ensayo de *Artemia salina* ha sido utilizado para determinar la presencia de componentes citotóxicos en los extractos vegetales. Los *nauplios* del crustáceo *Artemia salina* son muy sensibles a una gran variedad de sustancias químicas, lo cual sirve para determinar el grado de toxicidad de los extractos según el valor de la Concentración Letal Media (CL₅₀).

Para determinar el grado de toxicidad de los extractos usando el ensayo de *Artemia salina*, se realizó en función del rango en que se encontraron los valores de CL₅₀ de acuerdo con las categorías siguientes: extremadamente tóxico (CL₅₀ < 10 µg/mL), muy tóxico (10 < CL₅₀ < 100), moderadamente tóxico (100 < CL₅₀ < 1 000 µg/mL) y no tóxico (CL₅₀ > 1 000 µg/mL). (CYTED, 1995).

Preparación de Extractos y Adición de Larvas

Este ensayo se realiza en varias etapas: (CYTED, 1995)

El primer día se preparan los extractos, disolviendo 0,025 g del extracto seco en 25 mL de agua de mar artificial, la cual se prepara con 3.8 g de sal sin yodo (sal de Maras), en 100 mL de agua destilada, luego se filtra. Se coloca 50 mg de huevos de *Artemia salina* Leach en el agua de mar artificial con luz permanente y a una temperatura promedio de 28°C por un periodo de 24 horas para la eclosión de los huevos. Para cada muestra se usan 12 tubos de ensayo distribuidos de la siguiente manera: 3 tubos de ensayo para el grupo blanco, 3 tubos ensayo para la concentración de 10 ppm, 3 para 100 ppm y 3 para 1000 ppm.

En el segundo día, se pesan 0.025 g del extracto seco y se procede a realizar las diluciones, así para la dilución de 1000 ppm, se disuelven 0.025 g del extracto seco en 25 mL de agua de mar artificial (solución A), la cual se divide en 3 tubos de ensayo cada uno de 4 mL. Para la obtención de la dilución de 100 ppm, se toman 10 mL de la solución A y se afora a 100 mL (solución B). Luego se divide en 3 tubos de ensayo (4 mL para cada tubo de ensayo). Para la obtención de 10 ppm de la solución B se toman 10 mL aforándose a 100 mL y se divide en 3 tubos de ensayo (4 mL para cada tubo de ensayo).

Obtenidas las diluciones, se procede a la transferencia de 10 nauplios de *Artemia salina* Leach a los tubos de ensayo, utilizando pipetas Pasteur.

Los tubos se colocan en cámaras de poca iluminación y temperatura adecuada, durante 24 horas. Luego de este tiempo se realiza el conteo de sobrevivientes y muertos. Se utilizan grupos blanco, donde los tubos sólo contienen nauplios en agua de mar artificial, en las mismas condiciones que las anteriores. A todos los tubos (incluyendo los controles) se adiciona una gota de suspensión de levadura comercial como fuente de alimento (solución de 0.06% levadura seca por litro). Cada tubo alcanza un volumen final de 5 mL.

En el tercer día, se realiza el recuento del número de nauplios sobrevivientes en cada dilución. Para determinar la CL_{50} con 95 % de intervalo de confianza, se realizan los cálculos utilizando el método de análisis de Probit.

Resultados

Tabla 1

Resultados de las pruebas fitoquímicas cualitativas de las especies en estudio

Tipo de prueba	<i>Acicarpa tribuloides</i> Jussieu (Estrella Kisca)	<i>Gamochaeta spicata</i> (Queto-Queto)	<i>Minthostachys glabrescens</i> (Bentham) Epling (Muña)	<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Bentham) Endlicher (Mullaca)	<i>Piper elongatum</i> M. Vahl (Matico)
Flavonoides	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Compuestos fenólicos	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Quinonas	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Resinas	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo
Alcaloides	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Taninos	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Saponinas	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Lactonas sesquiterpénicas	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo

En la Tabla 1, muestra el análisis fitoquímico cualitativo realizado en el extracto seco de las cinco especies vegetales en estudio, donde se observa que las cinco plantas investigadas presentan en su composición flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos y saponinas. Las plantas *Acicarpa tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca), *Gamochaeta spicata* (Queto-Queto) y *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) contienen

resinas; mientras que, las lactonas sesquiterpénicas han dado positivo solamente para la especie *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham) Endlicher (Mullaca). En ninguna de las plantas se han identificado las quinonas.

Tabla 2

Resultados del análisis espectrofotométrico UV–visible del extracto seco de las especies vegetales investigadas

Longitud de onda	Acicarpha tribuloides Jussieu (Estrella Kisca)	Piper elongatum M. Vahl (Matico)	Muehlenbeckia volcanica (Bentham) Endlicher (Mullaca)	Minthostachys glabrescens (Bentham) Epling (Muña)	Gamochoeta spicata (Queto-Queto)	Metabolitos secundarios
λ	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	
200	0.9125			0.7549		flavonoides
210		0.9987	0.9718	0.9489		saponinas
225		1.0838	1.1331			Sesquiterpenlactonas α , β Insaturadas
232	1.1544				1.0818	flavonas
236	1.0416				1.0697	flavonoides
250	0.9584	0.9343		0.8673		terpenos compuestos aromáticos, fenol
260	0.9728					flavonoides
270	1.2455				1.1570	terpenos compuestos aromáticos, fenol
275			1.2308			flavonoides
279	1.1431					flavonas

Fuente: Elaboración propia basada en datos experimentales

En la tabla 2, se aprecian las longitudes de onda en las cuales se observaron picos de absorción para los diferentes metabolitos secundarios, donde las especies Estrella Kisca y Muña mostraron picos a 200 nm correspondiente a los flavonoides. Las saponinas que absorben a 210 nm están presentes en las especies Matico, Mullaca y Muña. A 225 nm en la cual absorben las lactonas sesquiterpénicas α , β insaturadas, mostraron picos de absorción el Matico y la Mullaca. Mientras que, a 232 nm y 236 nm, longitudes de onda para flavonas y flavonoides, observamos picos para la Estrella Kisca y el Queto-Queto. En el caso de los compuestos fenólicos que absorben a longitudes de onda de 250 y 270 nm, fueron identificados los picos para las especies Estrella Kisca, Matico, Muña y Queto-Queto. Los flavonoides (275 nm) se encontraron en la Mullaca y las flavonas (279 nm) en la Estrella Kisca.

Tabla 3

Evaluación de actividad antibacteriana a de extractos de especies vegetales y aceite esencial de Muña

Especie vegetal	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Salmonella typhimurium</i>	
	Efecto	CMI	Efecto	CMI	Efecto	CMI	Efecto	CMI
<i>Acicarpa tribuloides</i> (Jussieu (Estrella Kisca))								
	Negativo	0	Positivo	2.56 mg/mL	Negativo	0	Positivo	2.56 mg/mL
<i>Gamochaeta spicata</i> (Queto-Queto)								
	Positivo	1.28 mg/mL	Positivo	2.56 mg/mL	Positivo	1.28 mg/mL	Negativo	0
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Bentham) Endlicher (Mullaca)								
	Positivo	0.64 mg/mL	Positivo	2.56 mg/mL	Positivo	0.64 mg/mL	Negativo	0
<i>Piper elongatum</i> M. Vahl (Matico)								
	Positivo	0.64 mg/mL	Negativo	0	Positivo	1.28 mg/mL	Negativo	0
<i>Minthostachys glabrescens</i> (Bentham) Epling (Muña)*								
	Negativo	0.00%	Positivo	0.78%	Positivo	0.78%	Positivo	0.39%

*Se utilizó para el estudio antibacteriano aceite esencial.

En la tabla 3, se pueden observar los resultados de efecto antibacteriano de cinco especies vegetales frente a cuatro cepas bacterianas ATCC dos gram positivas (*Staphylococcus aureus* 29213, *Streptococcus pneumoniae* 49619) y dos gram negativas (*Escherichia coli* 25922 y *Salmonella typhimurium*). Se trabajaron con los extractos etanólicos y en caso de muña con el aceite esencial.

Acicarpa tribuloides Jussieu (Estrella Kisca) tiene efecto antibacteriano contra gram negativos para *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (CMI 2.56 mg/mL) y ausencia de actividad antibacteriana frente a gram positivos.

Gamochaeta spicata (Queto-Queto), presenta actividad antibacteriana frente al gram negativo *Escherichia coli* (CMI 2.56 mg/dL) no tiene efecto frente a *Salmonella typhimurium*. En cuanto a gram positivos tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* (CMI 1.28 mg/mL) y *Streptococcus pneumoniae* (CMI 1.28 mg/mL).

El aceite esencial de *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling (Muña), tiene efecto antibacteriano frente a gram positivos y gram negativos a excepción de *Staphylococcus aureus*.

Muehlenbeckia volcanica (Bentham) Endlicher (Mullaca), tiene efecto antibacteriano frente a *Streptococcus pneumoniae* (CMI: 0.64 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (CMI: 0.64 mg/mL) y *Escherichia coli* (CMI: 2.56 mg/mL). No tiene efecto antibacteriano frente a *Salmonella typhimurium*.

Piper elongatum M. Vahl (Matico), no tiene actividad antibacteriana contra los gram negativos *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Tiene actividad antibacteriana contra gram positivos *Staphylococcus aureus* (CMI 0.64 mg/mL) y *Streptococcus pneumoniae* (1.28 mg/mL).

Tabla 4

Prueba de citotoxicidad con Artemia salina Leach con los extractos secos en estudio

	<i>Dilución</i>	<i>Ensayo</i>	<i>Total de nauplios antes del ensayo</i>	<i>Total de nauplios vivos después del ensayo</i>	<i>Porcentaje de nauplios vivos</i>
<i>Acicarpa tribuloidea</i> (Estrella Kisca)	1000 ppm	1	10	0	
		2	10	0	0.00
		3	10	0	
	100 ppm	1	10	5	
		2	10	4	40.00
		3	10	3	
	10 ppm	1	10	5	
		2	10	4	43.33
		3	10	4	
Control	1	10	9		
	2	10	10	96.67	
	3	10	10		
<i>Gamochaeta spicata</i> (Queto – Queto)	1000 ppm	1	10	0	
		2	10	0	0.00
		3	10	0	
	100 ppm	1	10	3	
		2	10	2	16.67
		3	10	0	
	10 ppm	1	10	8	
		2	10	9	86.67
		3	10	9	
Control	1	10	10		
	2	10	10	96.67	
	3	10	9		

	<i>Dilución</i>	<i>Ensayo</i>	<i>Total de nauplios antes del ensayo</i>	<i>Total de nauplios vivos después del ensayo</i>	<i>Porcentaje de nauplios vivos</i>
<i>Mintostachys glabrescens</i> (Bentham) Epling (Muña)	1000 ppm	1	10	3	
		2	10	2	16.67
		3	10	0	
	100 ppm	1	10	3	
		2	10	4	43.33
		3	10	6	
	10 ppm	1	10	5	
		2	10	6	46.67
		3	10	7	
Control	1	10	8		
	2	10	8	86.67	
	3	10	10		
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Bentham) Endlicher (Mullaca)	1000 ppm	1	10	0	
		2	10	0	10.00
		3	10	3	
	100 ppm	1	10	8	
		2	10	8	80.00
		3	10	8	
	10 ppm	1	10	8	
		2	10	6	76.67
		3	10	9	
Control	1	10	9		
	2	10	7	86.67	
	3	10	10		
<i>Piper elongatum</i> M. Vahl (Matico)	1000 ppm	1	10	1	
		2	10	2	13.33
		3	10	1	
	100 ppm	1	10	3	
		2	10	5	40.00
		3	10	4	
	10 ppm	1	10	5	
		2	10	8	70.00
		3	10	8	
Control	1	10	9		
	2	10	9	90.00	
	3	10	9		

Fuente: Elaboración propia basada en datos experimentales

En la tabla 4, se muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad con *Artemia salina* Leach de los extractos, donde se puede evidenciar claramente que todos los extractos de las especies estudiadas muestran la mayor mortalidad a las 24 horas a la concentración de 1000 ppm, ya que a esta concentración el porcentaje de nauplios sobrevivientes fue el menor para todos los casos.

Tabla 5

Porcentaje de mortalidad y Concentración letal media de los extractos secos en estudio

	<i>Porcentaje promedio de mortalidad a las 24 horas</i>			<i>Concentracion letal media ug/mL</i>
	<i>10 ppm</i>	<i>100 ppm</i>	<i>1000 ppm</i>	
	<i>0.01 mg/mL</i>	<i>0.1 mg/mL</i>	<i>1 mg/mL</i>	
<i>Acicarpa tribuloides</i> Jussieu (Estrella Kisca)	55.17	58.62	100	19.639
<i>Gamochaeta spicata</i> (Queto – Queto)	10.34	82.75	100	58.104
<i>Minthostachys glabrescens</i> (Bentham) Epling (Muña)	46.15	50.01	80.77	100.092
<i>Muehlenbeckia volcanica</i> (Bentham) Endlicher (Mullaca)	11.53	7.69	88.46	415.451
<i>Piper elongatum</i> M. Vahl (Matico)	22.22	55.56	85.19	158.006

De acuerdo a los resultados de la Tabla 5, *Acicarpa tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca) y *Gamochaeta spicata* (Queto – Queto) se consideran muy tóxicos con una CL_{50} de 19.639 y 58.104 respectivamente. Por otro lado, la especie *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling (Muña) se encuentra justo en el límite para ser considerada muy tóxica con una CL_{50} de 100.092 y las especies consideradas moderadamente tóxicas son *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham) Endlicher (Mullaca) y *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) con CL_{50} de 415.451 y 158.006 respectivamente.

Discusión

Con respecto al análisis fitoquímico cualitativo y espectrofotométrico Uv-vis de las hojas de *Acicarpa tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca), no se han reportado investigaciones sobre el contenido de metabolitos secundarios en la especie investigada realizada por otros autores. En nuestro caso, se determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, resinas, alcaloides, taninos y saponinas

Existen pocos estudios sobre el análisis fitoquímico cualitativo realizado en el extracto etanólico de las hojas de *Gamochoeta spicata* (Queto-Queto). Los resultados de nuestra investigación coinciden con lo reportado por Lagos y Quinto (2018) que identificaron en la especie vegetal la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, resinas, alcaloides, taninos y saponinas.

En referencia al tamizaje fitoquímico realizado a la especie *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling (Muña) no se tuvieron coincidencias con otros estudios de la misma especie; sin embargo, Ambuludi y Cepeda (2015) y Lavado et al. (2021) que realizaron investigaciones en la especie *Minthostachys mollis* que corresponde al mismo género que la investigada, reportaron en su composición la presencia de saponinas, flavonoides, aceite esencial, alcaloides y taninos, resultados similares a los obtenidos en este estudio.

En el análisis fitoquímico cualitativo y espectrofotométrico Uv-vis en el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham) Endlicher (Mullaca), se encontraron flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas y lactonas sesquiterpénicas. No se encontraron estudios en la misma especie, no obstante, Ana Colina (2016) reportó en su estudio de la especie *Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst la presencia, en mayor proporción de flavonoides, saponinas y taninos (Colina, A., 2016)

Los hallazgos del estudio fitoquímico preliminar y espectrofotométrico Uv-vis de las hojas de *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) mostraron una abundante cantidad de flavonoides, compuestos fenólicos, resinas, alcaloides, taninos y saponinas. En concordancia con la investigación realizada por Valdez, R. (2014) que reporta en la misma especie la presencia de fenoles, taninos, flavonoides y alcaloides. Asimismo, hay coincidencia con los reportes efectuados por Arroyo, J. et al. (2012) que identificaron en la especie investigada, compuestos fenólicos, alcaloides y flavonoides.

De las cuatro cepas bacterianas evaluadas se observa que *Salmonella typhimurium* es la más resistente al efecto antibacteriano de las cinco especies vegetales estudiadas, a excepción de *Acicarpa tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca) y la muña con resultados positivos. Un estudio realizado con muestras de *Salmonella typhimurium* evidencian resistencia a múltiples antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomycin, sulfamidas, siendo el principal mecanismo de resistencia la transferencia de información genética dentro del género (De Toro y col., 2014), lo cual podría explicar también la resistencia a los principios activos de los extractos de especie vegetales.

La ausencia de efecto antibacteriano de *Acicarpa tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca) frente a gram positivos se puede deber a la presencia de peptidoglicano en la pared celular es mayor en comparación a los gram negativos. Resultados diferentes fueron hallados por Jara V (2017), quien encontró actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* (bacteria gram positiva). No se encontraron otros estudios similares en esta especie vegetal. Según el estudio fitoquímico cualitativo, el extracto contiene flavonoides y compuestos fenólicos a los cuales se les atribuye el efecto antimicrobiano.

Respecto a *Gamochaeta spicata* (Queto-Queto), en el estudio realizado por Andrade, (2015) que trabaja con aceites esenciales de *Gnaphalium pellitum* donde se encuentra el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

No se encontraron estudios con *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling (Muña). En el estudio realizado por Torrenegra-Alarcón y col. 2016, evaluaron la actividad antibacteriana de la especie vegetal *Minthostachys mollis*, cercana a la especie vegetal del presente estudio, hallando efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC. Lo cual coincide con los resultados del presente estudio. Mostrando adicionalmente actividad frente a *Streptococcus pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*.

Muehlenbeckia volcanica (Bentham) Endlicher (Mullaca), respecto al efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* el presente estudio coincide con el estudio realizado por Lagos y Quinto (2018). No se encontraron antecedentes para las otras especies bacterianas.

Piper elongatum M. Vahl (Matico), sobre el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* el presente estudio coincide con lo hallado por Zuta N. (2014), que trabajo con la variedad *Piper angustifolium* quien encontró inhibición con altas concentraciones frente *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Respecto a las demás especies bacterianas no se encontraron antecedentes de estudios.

Según el perfil fitoquímico de las especies vegetales en estudio (tabla 1), todas presentan flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales según diversos estudios contienen efecto antibacteriano. Lo cual estaría relacionado con la existencia de grupos hidroxilo (OH^-) y cierto grado de lipofiliidad. (Laks y Pruner, 1989). Así también los fungicidas comerciales, tienen su efecto por la acidez del grupo hidroxilo por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Los protones son conducidos a través de la membrana mitocondrial destruyendo el diferencial de protones producidos en el transporte electrónico requerido para la formación de ATP. En compuestos fenólicos con un grado de lipofiliidad, mientras mayor sea su número de grupos hidroxilos, resultarán más eficientes desacopladores, ya que, podrían transferir más protones por molécula. Dado que las bacterias no poseen mitocondrias, este mismo mecanismo es el que podría estar operando en la actividad antibacteriana ejercida por los flavonoides, pero a nivel de membrana citoplasmática. (Hammond y Lambert, 1981).

Como se puede observar en la tabla 5, la CL_{50} de *Acicarpha tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca) es de 19.639 ug/mL lo que indica que este extracto es muy tóxico debido a que se encuentra por debajo del valor de 100 ug/mL. Para *Gamochaeta spicata* (Queto – Queto), la CL_{50} es de 50.104 ug/mL lo que demuestra que este extracto es muy tóxico debido a que se encuentra por debajo del valor de 100 ug/mL. Luego se tiene que, para *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling (Muña), la CL_{50} es de 100.092 ug/mL lo que indicaría que este extracto es moderadamente tóxico. Por otro lado, se tiene a *Muehlenbeckia volcanica* (Bentham) Endlicher (Mullaca) cuya CL_{50} es de 415.451 ug/mL que es el valor más alto entre todas las especies estudiadas lo que indicaría que este extracto está considerado como moderadamente tóxico y más aún, es el menos tóxico entre todas las especies estudiadas. Finalmente se tiene el valor de CL_{50} de *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) que es de 158.006 ug/mL lo que indicaría que este extracto está considerado como moderadamente tóxico.

Es importante resaltar que las especies vegetales estudiadas, no siempre muestran una concentración letal baja que demostraría su alta bioactividad o citotoxicidad y esto podría explicarse a las condiciones ambientales de su hábitat natural (tipo de tierra, pH, altura, humedad y otros) que influyen en la presencia y concentración de determinados metabolitos secundarios o principios activos. (Aranda-Ventura J. et al., 2018)

Por otro lado, la ausencia de citotoxicidad frente a *Artemia salina* indicaría que la planta estudiada podría ser bien tolerada por los sistemas biológicos, pero para constatar esto, siempre se puede implementar más estudios como pruebas in vivo. Asimismo, si la prueba con *Artemia* resulta positiva, es decir se verifica la citotoxicidad de los extractos, esto abre la posibilidad de evaluar si existe o no el efecto farmacológico que se esté buscando implementando ensayos in vivo u otros. (Aranda-Ventura J. et al., 2018)

Plazas E. et al. (2008) en su estudio “Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidicum Kunth* (Piperaceae) y derivados acetilados” reporta que los compuestos naturales y sus derivados que fueron sometidos al ensayo con *Artemia salina* mostraron que el flavonoide 5-hidroxi-7-metoxiflavanona presentó una CL_{50} de 1.8 ug/mL que es una concentración letal bastante baja que la que muestra este metabolito, en comparación con el extracto estudiado que aun siendo del mismo género, su toxicidad es moderada. Esto puede indicar que los extractos de las piperáceas son en general menos tóxicos que sus metabolitos. En comparación con nuestro estudio, el extracto de la especie *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) mostró una CL_{50} de 158.006 ug/mL, muy superior al metabolito investigado por Plazas E. et al.

Los estudios con enfoque etnobotánico como el realizado por Desmarchelier et al. (1995) sobre plantas utilizadas en la medicina tradicional de un grupo indígena Takana de la Amazonía peruana, muestra la riqueza de este grupo étnico, utilizando como uno de los bioensayos el de *Artemia salina* Leach, determinándose entre las 50 plantas descritas, la concentración letal media por el método estadístico Probit de dos especies vegetales, *Gamochaeta spicata* (Queto – Queto), cuyos extractos metanólico y diclorometánico mostraron una CL_{50} mayor a 1000 ug/mL en ambos casos y para la especie *Piper angustifolium* R. et P., se obtuvo una CL_{50} de 719 ug/mL para el extracto metanólico y de 220 ug/mL para el extracto diclorometánico. De acuerdo al criterio de actividad propuesto por Meyer et al., si se obtiene una CL_{50} menor a 1000 ug/mL es indicativo de un extracto activo. Además, Desmarchelier et al., determinó que, *Gamochaeta spicata* (Queto – Queto) no resultó activo, mientras que *Piper angustifolium* en ambos tipos de extractos, metanólico y diclorometánico, mostraron ser activos. A diferencia de este estudio, en nuestra investigación, el extracto etanólico de *Gamochaeta spicata* (Queto – Queto), mostró ser activo, con una CL_{50} de 58.4 ug/mL., al igual que el extracto de *Piper elongatum* M. Vahl (Matico), del mismo género que la especie estudiada por Desmarchelier et al., que también mostró ser muy activo con una CL_{50} de 158.006 ug/mL.

En cuanto al género Piper específicamente, en Colombia se usa en el tratamiento de diarreas, disentería, dolores de estómago, caries dentales, cicatrizante, para prevenir las caries y como estimulante ya que produce un efecto narcótico y se dice que tiene una acción similar a la coca. También se reporta su uso en las comunidades indígenas del departamento de Chocó como antiinflamatorios, analgésicos, antirreumáticos y contra la picadura de serpientes. (Plazas, 2008).

Los resultados del presente trabajo de investigación permiten conocer aún más sobre las propiedades farmacológicas de especies vegetales que crecen en la zona altoandina y amazónica del Cusco, la mayoría aún poco estudiadas, sobre todo en relación

a su actividad antibacteriana y la citotoxicidad, por lo que se sugiere profundizar el estudio de especies nativas y ahondar en el conocimiento de sus metabolitos activos, siempre en la búsqueda de sustancias activas con posibilidades de uso en la industria farmacéutica.

Las implicancias de los resultados de esta investigación se encuentran sobre todo en que proporciona los datos que sustentan el uso de estas plantas desde el punto de vista del conocimiento popular transmitido a través del tiempo de una generación a otra en un país donde la fitoterapia es una de las formas más arraigadas en la población, y de esta forma promover su utilización segura y eficaz.

Conclusiones

Se llegaron a las siguientes conclusiones: el análisis fitoquímico cualitativo y espectrofotométrico UV-Vis, demostró que las plantas investigadas contienen en mayor cantidad compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y saponinas. Con respecto a la actividad antibacteriana, el extracto etanólico de las hojas de Queto-Queto y Mullaca tienen efecto frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae*, mientras que, el extracto etanólico de las hojas de Matico actúa frente *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. En el caso del extracto etanólico de la Estrella Kisca y el aceite esencial de Muña dieron positivo frente a *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*. La Muña también dio positivo a *Streptococcus pneumoniae*. La prueba de citotoxicidad con *Artemia salina*, demostró que, los extractos de *Acicarpha tribuloides* Jussieu (Estrella Kisca) y *Gamochaeta spicata* (Queto – Queto) son muy tóxicos con una CL₅₀ de 19.639 y 58.104 respectivamente. Por otro lado, los extractos considerados moderadamente tóxicos son los de *Minthostachys glabrescens* (Benth) Epling (Muña), *Muehlenbeckia volcanica* (Benth) Endlicher (Mullaca), *Piper elongatum* M. Vahl (Matico) con CL₅₀ de 100.092, 415.451 y 158.006 respectivamente. Todas las especies investigadas en el presente estudio son consideradas prometedoras desde el punto de vista de sus propiedades farmacológicas, en la búsqueda de nuevas sustancias activas para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco a través de fondos canon. Agradecemos a los asistentes de investigación que colaboraron en la ejecución del proyecto.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias

- Agapito, F. y Sung, I. (2005). Fitomedicina: 1100 *Plantas Medicinales*. Isabel.
- Aguirre, L. G., Pereyra-Aguilar, P., Silva-Arrieta-Ontaneda, I., Alarcón-Urbina, M., Palacios-Quintana, M., Medina-Salazar, H., & Luján-Carpio, E. (2016). Consumo de plantas medicinales en usuarios del “Centro Integral del Adulto Mayor” de la Punta-Callao (Perú). *Revista de Fitoterapia*, 16(2), 165-175. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6088954>
- Alfonso, M., Fernández, L., González, N., Avilés, R. (2000). *La Achira (Canna edulis Ker.) y su potencialidad en el control de plagas*. Ponencia. XII Fórum de Ciencia y Técnica. NIFAT, La Habana. Cuba.
- Ambuludi, D., & Cepeda, N. (2015). *Estudio fitoquímico preliminar del follaje de minthostachys mollis cultivada en Quito*. [Trabajo de titulación, UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Química y de la Salud, Machala, Ecuador]. Repositorio institucional UTMACH. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/3704>
- Andrade, W. (2015). *Composición de los aceites esenciales de las hojas de conyza bonariensis, gnaphalium pellitum y achyrocline satureioides, por cg-em y evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante*. [Tesis de titulación, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio institucional universidad Javeriana. <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/20619>
- Aranda-Ventura, J., Villacrés-Vallejo, J., Nuñez-Tuesta, L., Marín-Sisley, P., Nonato-Ramírez, L. & González-Aspajo G. (2018). Evaluación de la Bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de Artemia salina. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 3(3). <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2018.33.93>
- Arroyo, J., Hañari, H., Tinco, A., Baca, D., Domínguez, L., Buendía, J. (2012). Efecto antihipertensivo del extracto Piper aduncum “matico” sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones. *Revista Anales de la Facultad de Medicina*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 73(4) oct/dic. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832012000400002
- Brack Egg, A. (1999). Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. *Centro Bartolomé de las Casas*.
- Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2016). Uso de Plantas medicinales en los Andes Norte del Perú. *Ethnobotany Research and Applications*, 15(1), 1-293. <https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/1285>

- Canal Gallego, D. (2011), *Cestrum de Colombia (Solanaceae): estudio taxonómico de las especies de tricomas simples*. [Tesis de titulación, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional UNAL. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/7722>
- CIPI - Centro de Investigación de la Producción Industrial (1994). *Catálogo de Plantas Medicinales*. Universidad de Lima. Facultad de Ingeniería Industrial. Lima.
- Claus, E. (1980). *Farmacognosia. El Ateneo*. Buenos Aires, Argentina.
- Colina, A. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco)*. [Tesis de titulación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú]. Repositorio institucional cybertesis. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7121>
- CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (1995). *Manual de Técnicas de Investigación. Búsqueda de Principios Activos en Plantas de la Región*. CYTED.
- De Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., y Sáenz, Y. (2024). Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(1), 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.006>
- Desmarchelier, C., Mongelli, E., Coussio, J., Giulietti, A., Ciccía, G. (1995). Etnobotánica y Bioactividad de Plantas medicinales utilizadas por un Grupo Indígena Takana de la Amazonía Peruana. *Acta Farmacia Bonarense* 14(3), 195-208. http://www.latamjpharm.org/trabajos/14/3/LAJOP_14_3_1_6_996D8765SA.pdf
- Font Quer, P. (1982). *Diccionario de Botánica (2ª ed.)*. Península.
- Granados, R. y Villaverde, C. (1997). *Microbiología. Paraninfo*.
- Huamantupa, I., Cuba, M., Urrunaga, R., Paz, E., Ananya, N., Callalli, M., Pallqui, N., & Coasaca, H. (2011). Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expendidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 283-292. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332011000300004&script=sci_arttext
- Jara V. (2017). *Efecto antimicrobiano in vitro de acicarpha tribuloides juss (estrella kiska), frente A Streptococcus mutans*. [Tesis de titulación, Universidad Andina del Cusco]. Repositorio institucional UAC. <https://repositorio.uandina.edu.pe/handle/20.500.12557/1806>

- Lagos, D. & Quinto, R. (2018). *Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de Muehlenbeckia volcánica (benth.) endl. (mullaca) en cepas de Staphylococcus aureus ATCC 6538, in vitro*. [Tesis de titulación, UIGV. Lima Perú]. Repositorio institucional Universidad Inca Garcilaso de la Vega. <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/3074>
- Laks, P. & Pruner, M. (1989). Flavonoid biocides: Structure/activity relations of flavonoid phytoalexin analogues. *Phytochemistry*, 28; 87.
- Lavado, I., Andamayo, D., Castillo, D., Junchaya, V. (2021). Evaluación preliminar de 10 plantas medicinales del Valle del Mantaro mediante el método cualitativo (fitoquímico) para uso farmacéutico. *Revista Visionarios en Ciencia y Tecnología* 6:38-48. <https://revistas.uroosevelt.edu.pe/index.php/VISCT/article/view/88/135>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2002). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Programa de medicina tradicional*. OMS. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67314/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf;jsessionid=4F845D3E2D110A0A71F8C6650857F7D9?sequence=1
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2000) Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. OMS. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67719>
- Palacios, J. (1993). *Plantas medicinales nativas del Perú*. (1ª Ed). CONCYTEC. ABBSA. pp. 50-53.
- Plazas, E., Cuca, L., Delgado, A., Wilman, A. (2008). Flavonoides aislados de las Inflorescencias de Piper hispidum Kunth (Piperaceae) y Derivados Acetilados. *Revista Colombiana de Química*, 37(2), 135-144 http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-28042008000200002&script=sci_abstract&tlng=en
- Rojas, J. (1986). Farmacobotánica. *Guía de Descripciones Morfológicas y Ubicación Sistemática de las Especies Vegetales del Jardín Botánico de la facultad de Farmacia y bioquímica*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
- Salaverry, O. (2005). La complejidad de lo simple: Plantas medicinales y sociedad moderna. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(4), 245-246. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342005000400001
- Schulz V., Hansel R., y Tyler V., (2002), *Fitoterapia Racional. Guía de Fitoterapia para las Ciencias de Salud*. (4ª ed.). Manole Ltda., Tambore, Brasil, pp. 98-101.
- Torrenegra-Alarcón, M., Granados-Conde, C., Durán-Lengua, M., León-Méndez, G., Yáñez-Rueda, X., Martínez, C., & Pájaro-Castro, N. (2016). Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Mintostachys mollis*.

Orinoquia, 20(1), 69-74. <https://www.redalyc.org/pdf/896/89647074008.pdf>

Trease-Evans (1991). Farmacognosia. (13^a. Ed.). *Interamericana*. México.

U.S.P. (2015). United States Pharmacopeia. Volumen 38. Formulario NF 33.

Valdez, R. (2014). *Contenido de fenoles totales y flavonoides totales en Oenothera rosea Ait “yawar suqu”, Baccharis salicifolia R&P “chilca” y Piper elongatum Vahl “matico”*. [Tesis de titulación, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. Repositorio institucional UNSCH. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2502>

Woods, G. & Washington, J. (1995). Antibacterial susceptibility test: dilution and diskdiffusion methods. *In Manual of clinical microbiology*. (6^a ed.). American society of Microbiology.

Zuta, N. (2014). *Actividad antibacteriana in vitro de extractos de piper angustifolium (matico) y Matricaria chamomilla (manzanilla) en cepas de Staphylococcus aureus con resistencia múltiple*. [Tesis de titulación, Universidad Nacional del Callao. Perú]. Repositorio institucional UNAC. <http://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/943>