

ACTIVIDAD ANTIESTAFILOCÓCCICA Y ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Juglans neotropica* DIELS, *Piper lineatum* RUIZ&PAV. Y *Terminalia catappa* L.

Antistaphylococcal activity and antibiofilm activity of the extracts of *Juglans neotropica* Diels, *Piper lineatum* Ruiz & Pav. and *Terminalia catappa* L.

Julio R Ruiz¹, Mirtha Roque¹, María E Salazar¹, Gerardo Gamarra¹, Gladys C Arias², Delia Y Whu¹, Emma M Acosta¹, José Irey¹, Luz F Guadalupe¹, José A Llahuilla², José F Chávez³, Deyvis D Solis³, Goannie J Basualdo³, Oscar G Santa Cruz³

¹Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo"; ²Instituto de Investigaciones en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"; ³Estudiante de Pregrado. UNMSM

RESUMEN

En este estudio, se investigó la actividad antiestafilocócica *in-vitro* de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de 3 plantas medicinales peruanas: *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper lineatum* Ruiz & Pav. (hojas) y *Terminalia catappa* L. (hojas); recolectadas en las regiones de Amazonas y Cajamarca, en el Perú. La actividad antiestafilocócica se evaluó mediante el método de microdilución. Los microorganismos utilizados fueron las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Los extractos investigados presentaron actividad significativa frente a ambas bacterias, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 125 a 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, teniendo mayor actividad el extracto etanólico de *Juglans neotropica* Diels, y de 250 a 500 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis*, teniendo mayor actividad el extracto hidroalcohólico de *Piper lineatum* Ruiz & Pav. El análisis fitoquímico confirmó la presencia de compuestos terpénicos, flavonoides y alcaloides en los 6 extractos estudiados. La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula (CMIB) se efectuó por el método de microdilución en placa modificado, utilizando cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* productoras de biopelícula. Solamente los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Piper lineatum* L. poseen actividad significativa con CMIB de 500 µg/mL para ambas cepas. Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Piper lineatum* L. pueden ser buenos candidatos para la búsqueda de metabolitos que sirvan para combatir infecciones asociadas a biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Palabras clave: Actividad antiestafilocócica, actividad antibiopelícula, *Piper lineatum*, *Juglans neotropica*, *Terminalia catappa*.

SUMMARY

In this study, was investigated the antistaphylococcal activity *in vitro* of ethanol and hydroalcoholic extracts of 3 peruvian medicinal plants: *Juglans neotropica* Diels (bark), *Piper lineatum* Ruiz & Pav. (leaves) and *Terminalia catappa* L. (leaves). The species were collected in the regions of Amazonas and Cajamarca, in Peru. Antistaphylococcal activity was assessed by microdilution method. The organisms used were bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. All extracts investigated showed significant activity against both bacteria with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 125 to 500 µg/mL for *Staphylococcus aureus*, with increased activity of the ethanol extract of *Juglans neotropica* Diels, and of 250 to 500 µg/mL for *Staphylococcus epidermidis*, having greater activity the hydroalcoholic extract of *Piper lineatum* Ruiz & Pav. Phytochemical analysis confirmed the presence of terpene compounds, flavonoids and alkaloids on 6 extracts studied. The determination of Minimum Inhibitory Concentration of Biofilm (MICB) was performed by the plate microdilution method modified, using clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilm producing. Only hydroalcoholic and ethanolic extracts of leaves of *Piper lineatum* L. have significant activity with CMIB 500 µg/mL for both strains. The ethanol and hydroalcoholic extracts of *Piper lineatum* L. may be good candidates to search of metabolites useful to combat biofilm-associated infections by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.

Keywords: Antistaphylococcal activity, anti-biofilm activity, *Piper lineatum*, *Juglans neotropica*, *Terminalia catappa*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas representan un problema crítico de salud y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, a nivel mundial. En la naturaleza, la mayoría de los microorganismos viven en grupos

formados por muchedumbres, que se adhieren a una superficie, este tipo de comunidades se conoce como biopelícula ⁽¹⁾. La biopelícula es uno de los factores de virulencia más importantes de los estafilococos y juega un papel en muchas infecciones tales como la endocarditis de válvula nativa, otitis media, infecciones

del tracto urinario, fibrosis quística, artritis séptica aguda y otras relacionadas con dispositivos médicos ⁽²⁾.

Es ampliamente conocido que el Perú es uno de los países megadiversos del mundo y posee una amplia cultura con respecto al uso de las plantas medicinales. La Amazonia peruana es una de las zonas del planeta con mayor diversidad vegetal, de la cual menos del 1% ha sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico, por lo que su estudio podría conducir al descubrimiento de un gran número de nuevas moléculas bioactivas con posible aplicación terapéutica ⁽³⁾.

En este proyecto, se investigaron plantas medicinales peruanas con gran actividad antibacteriana, procedentes de las regiones Amazonas y Cajamarca, que podrían servir como candidatas para el desarrollo de agentes antimicrobianos y/o fitomedicamentos estandarizados.

En el Perú, *Juglans neotropica* Diels (Nogal) se encuentra entre 1000 y 3000 msnm, en las regiones de Amazonas, Cusco, Huánuco, Junín, Lima, Loreto, San Martín, Ucayali ⁽⁴⁾. En lo que respecta a este género, Quave y col., demostraron que *Juglans regia* tiene actividad antibiopelícula contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistente con una $CI_{50} < 32 \mu\text{g/mL}$ ⁽⁵⁾.

Se calcula que en nuestro país existen aproximadamente 811 especies de la familia Piperaceae, repartidas en 3 géneros, de las cuales 528 son nativas ⁽⁶⁾. Entre ellas encontramos a *Piper lineatum* Ruiz & Pav. Marçal y col., han demostrado que el extracto de acetato de etilo de las hojas *Piper regnellii*, posee CMI de 16 $\mu\text{g/mL}$ contra *Staphylococcus aureus* meticilina resistente ⁽⁷⁾.

Terminalia catappa L. (Castañilla) se encuentra en la selva peruana, se ha reportado que el extracto etanólico de sus hojas tiene actividad contra bacterias Gram positivas, entre ellas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* ⁽⁸⁻⁹⁾, y bacterias Gram negativas ⁽⁸⁾.

Los objetivos de la investigación fueron: determinar la CMI y la CMIB de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las plantas seleccionadas, mediante la prueba de microdilución en placa contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las plantas que se describen en la tabla 1 fueron recolectadas en las regiones de Amazonas y Cajamarca. El material recolectado fue acondicionado y estabilizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Una vez secada la muestra se sometió a un proceso de reducción de tamaño de partículas en un molino de cuchillas N°21.

Preparación de los extractos

Se trabajó con la droga en polvo de las especies elegidas (tabla 1). La extracción etanólica se realizó por maceración a temperatura ambiente con etanol al 95%, utilizando la proporción de 1:10 P/V por 72 h. Para los extractos hidroalcohólicos se utilizó la misma proporción del preparado etanólico, con la diferencia que el solvente de extracción fue etanol:agua (70:30). Los extractos obtenidos se filtraron, rota- evaporaron y conservados en refrigeración ⁽⁵⁾. Para los bioensayos, los extractos fueron resuspendidos a una concentración de 10 mg/mL, diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO), esterilizados por filtración (0,2 μm) y almacenados a 4°C.

Análisis fitoquímico preliminar

Los extractos fueron sometidos a cromatografía en capa fina en placas (GF 254 60; Merck) 250 mm de espesor;

Tabla 1. Plantas medicinales seleccionadas para el ensayo antimicrobiano.

Especie	Familia	Nombre común	Parte usada
<i>Juglans neotropica</i> Diels	Juglandaceae	Nogal	Corteza
<i>Piper lineatum</i> Ruiz & Pav.	Piperaceae	Luto	Hojas
<i>Terminalia catappa</i> L.	Combretaceae	Castañilla	Hojas

Tabla 2. Análisis fitoquímico preliminar por cromatografía de capa fina.

Muestras	Rf de Compuestos			
	Alcaloides	Flavonoides	Cumarinas	Terpenos
Extracto etanólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels		0,7894 0,6842 0,421		0,4
Extracto etanólico de <i>Piper lineatum</i> Ruiz & Pav.	0,741	0,8 0,5764 0,411	0,75	0,9058 0,7294 0,5882
Extracto etanólico de <i>Terminalia catappa</i> L.	0,6364	0,1515	0,2424	0,7575
Extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels		0,4421 0,8631 0,9263		0,2421
Extracto hidroalcohólico de <i>Piper lineatum</i> Ruiz & Pav.		0,3678 0,7471 0,885 0,931		0,908 0,7471 0,5862
Extracto hidroalcohólico de <i>Terminalia catappa</i> L.	0,606	0,09	0,6263	0,8

Rf: Ratio of front

fueron desarrollados con cloroformo:metanol:agua (80:18:2), que permitió la separación de componentes en un amplio rango de valores de Rf. Los componentes fueron visualizados bajo luz UV (254 y 366 nm) y revelados con los reactivos de Dragendorff modificado, hidróxido de potasio metanólico, cloruro de aluminio y anisaldehído/ácido sulfúrico, para alcaloides, cumarinas, flavonoides y terpenos, respectivamente ⁽¹⁰⁾.

Bacterias y condiciones de cultivo

Se usaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 para la determinación de la CMI; así como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* meticilino resistentes productores de biopelículas para la determinación de la CMIB. Las bacterias fueron sembradas en placas de agar tripticasa soya (Merck) e incubadas a 37°C por 18-24 h. Para preparar el inóculo base se resuspendieron colonias en solución salina estéril al 0,85% y se ajustó a la turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland, que sirvió para determinar la CMI y la CMIB ⁽⁵⁾. Se realizaron las diluciones necesarias con caldo Mueller Hinton (Merck) cuando el ensayo lo requirió.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se realizó de acuerdo al método de Sarker y col. ⁽¹¹⁾, pero con modificaciones. El ensayo usó placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano y estériles (Brand), caldo Mueller Hinton (Merck) y resazurina (Sigma) como marcador de células vivas. Los extractos se prepararon a concentraciones de 7,81 - 4000 µg/mL y el control vancomicina de 8 - 1024 µg/mL en diluciones dobles seriadas, utilizando como diluyente final caldo Mueller Hinton, que representaron el doble de concentración final deseada. Se incluyeron pozos de control de crecimiento (bacterias más caldo Mueller Hinton) y control de esterilidad (caldo Mueller Hinton). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Las diluciones de los extractos se dispensaron en los pozos de las placas de microdilución a razón de 100 µL de cada una de las diluciones. Luego se adicionó a cada pozo 100 µL del inóculo 2x que ya incluía la solución indicadora de resazurina (de acuerdo al método de Liu y col. ⁽¹²⁾), para alcanzar el inóculo final de 5 x 10⁵ ufc/mL ⁽¹¹⁾. Las placas se llevaron a incubación a 37°C por 18-24 h. El cambio de color se evaluó visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado se registró como positivo. La concentración más baja en la que no se produjo cambio de color se tomó como el valor de CMI ⁽¹¹⁾.

Comprobación de la formación de biopelículas

Se evaluó la habilidad de formar biopelículas de las cepas de estudio por el método de Freeman y col. ⁽¹³⁾.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB)

El método de Antunes y col. ⁽¹⁴⁾, con modificaciones, consiste en evaluar el efecto de los extractos sobre biopelículas formadas en microplacas estériles de 96 pozos, de fondo plano (Brand); en las que a cada pozo se agregaron 100 µL del inóculo (5 x 10⁵ ufc/mL) de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* productoras de biopelícula. Como control de esterilidad se usó una columna con sólo caldo Mueller Hinton (control de esterilidad), incubándose por 24 h a 37°C. Posteriormente se procedió a retirar el contenido de los pozos y agregar 100 µL de las diluciones de los extractos (3,91 - 2000 µg/mL) y vancomicina (4 - 512 µg/mL). Seguidamente se reincubaron las microplacas por 24 h a 37°C, se retiraron los contenidos de los pozos y enjuagaron 3 veces con solución salina fisiológica estéril. Luego se secaron los pozos a 37°C y se les agregó 100 µL de caldo Mueller Hinton con resazurina. Se incubaron las microplacas de 30-60 min a 37°C y se procedió a su lectura visual. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado se registró como positivo. La concentración más baja a la que no presentó cambio de color se tomó como el valor de la CMIB ^(12,14).

RESULTADOS

Análisis Fitoquímico Preliminar

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de alcaloides, flavonoides y terpenos en los 6 extractos estudiados: extractos etanólicos e hidroalcohólicos de *Juglans neotropica* Diels, *Piper lineatum* y *Terminalia catappa*. Los valores de frente de solventes Rf (Ratio of front) de las 6 muestras se presentan en la tabla 2.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Todos los extractos tuvieron una CMI < 1000 µg/mL, la cual es significativa según los criterios de Holetz y col. ⁽¹⁵⁾. Los resultados se muestran en la tabla 3 y en la figura 1.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula (CMIB)

Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos crudos.

Especies de plantas	Partes de las plantas ensayadas ^a	Tipo de extractos ^b	CMI (µg/mL)		CMIB (µg/mL)	
			<i>S.a.</i>	<i>S.e.</i>	<i>S.a.*</i>	<i>S.e.*</i>
<i>Juglans neotropica</i>	C	E	125	125	2000	1000
	C	HA	500	500	2000	250
<i>Piper lineatum</i>	H	E	250	250	500	250
	H	HA	500	250	500	500
<i>Terminalia catappa</i>	H	E	250	250	>2000	2000
	H	HA	500	500	>2000	2000
Control						
Vancomicina			< 4,0	< 4,0	< 4,0	< 4,0

(a) Partes de las plantas ensayadas: C, corteza; H, hojas CMI: concentración mínima inhibitoria

(b) Tipo de extractos: E, etanólico; HA, hidroalcohólico CMIB: concentración mínima inhibitoria de biopelícula

S.a.: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

S.e.: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

* Productora de biopelícula

DISCUSIÓN

Los extractos etanólico e hidroalcohólico de la corteza de *Juglans neotropica* Diels poseen muy buena actividad contra las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, con CMIs de 125 µg/mL y 500 µg/mL. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Ruiz & Roque⁽⁹⁾ y Lopez y col.⁽¹⁶⁾, que en sus estudios sólo demostraron la actividad contra *Staphylococcus aureus* por métodos de difusión. También se ha reportado que el aceite esencial de hojas de *Juglans regia* tiene buena actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*⁽¹⁷⁾. Por otro lado Oliveira y col.⁽¹⁸⁾ encontraron CMI de 100 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* con el extracto acuoso de la nuez de *Juglans regia*, siendo este valor cercano al encontrado en la presente investigación.

El análisis fitoquímico reporta la presencia de flavonoides y terpenos en ambos extractos de la corteza de *Juglans neotropica* Diels; estos compuestos podrían explicar su actividad antiestafilocócica⁽¹⁹⁾. En cuanto a la actividad anti-biopelícula, ambos extractos son inactivos frente a la biopelícula de *Staphylococcus aureus*, con valores de 4 a 5 veces de su CMI. Sin embargo, los extractos etanólico e hidroalcohólico tienen CMIB de 1000 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente, contra la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis*, siendo este último valor la mitad del encontrado para su CMI. La literatura reporta que los frutos inmaduros de *Juglans regia* tienen una buena actividad anti-biopelícula con una concentración inhibitoria de formación de biopelícula de *Staphylococcus aureus* al 50% de 16 µg/mL⁽⁵⁾.

Los extractos etanólico e hidroalcohólico de las hojas de *Piper lineatum* L. mostraron actividad significativa

contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* con CMI de 250 µg/mL, lo que se cataloga como de mediana actividad⁽¹⁶⁾. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Ruiz & Roque con el método de difusión en agar⁽⁹⁾ y con los hallazgos de De la Cruz⁽²⁰⁾.

El género *Piper* es conocido por su

actividad antimicrobiana. Se han observado resultados similares, en cuanto a la actividad antibacteriana contra Gram positivos, del extracto de partes aéreas de *Piper aduncum*⁽⁸⁾ y del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Piper regnellii*⁽²¹⁾.

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de alcaloides, cumarinas, flavonoides y terpenos en el extracto etanólico de las hojas de *Piper lineatum* L., y de sólo flavonoides y terpenos en su extracto hidroalcohólico; estos compuestos fitoquímicos podrían explicar su actividad antiestafilocócica⁽¹⁹⁾. Los resultados de la CMIB de los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de esta planta, son de 500 µg/mL para biopelículas de *Staphylococcus aureus*, siendo apenas 2 veces la CMI en el caso del extracto etanólico y manteniéndose el mismo valor que el CMI en el extracto hidroalcohólico.

Respecto a los valores de CMIB contra las biopelículas de *Staphylococcus epidermidis*, estos fueron de 250 µg/mL y 500 µg/mL, para el extracto etanólico e hidroalcohólico, respectivamente. Estos valores casi no varían de su CMI. Esta planta debe ser investigada con mayor profundidad, debido a los excelentes resultados encontrados en la presente investigación.

Los extractos etanólico e hidroalcohólico de las hojas de *Terminalia catappa* mostraron actividad antiestafilocócica significativa contra ambos *Staphylococcus*, con una CMI de 250 µg/mL del extracto etanólico para ambas cepas y de 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico. Estos resultados concuerdan con los reportados en otros estudios^(8,22).

Otras especies del género también reportan actividad antiestafilocócica, por ejemplo los extractos de la corteza del tallo y la raíz de *Terminalia chebula* y *Terminalia bellerica*⁽²³⁾. El análisis

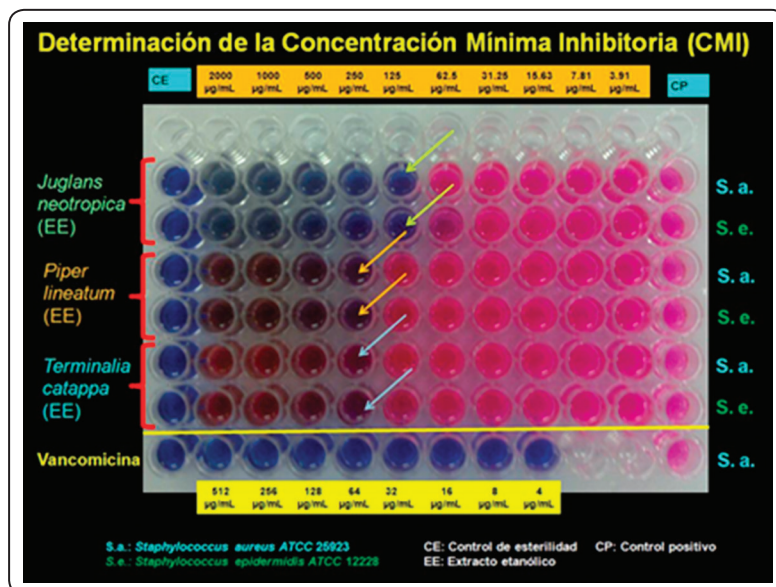


Figura 1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.

fitoquímico preliminar reveló la presencia, en ambos extractos de *Terminalia catappa* L., de alcaloides, cumarinas, flavonoides y terpenos, aunque en menor cantidad a los hallados en *Piper lineatum* Ruiz & Pav.; estos metabolitos pueden explicar su acción antibacteriana⁽¹⁹⁾. Tabopta y col., reportaron que un derivado triterpénico de *Terminalia superba* posee actividad antibacteriana⁽²⁴⁾. Los extractos de *Terminalia catappa* L. no tuvieron actividad significativa contra las biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, reportando CMI ≥ 2000 µg/mL.

CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de la corteza de *Juglans neotropica* Diels, de hojas de *Piper lineatum* Ruiz & Pav. y hojas de *Terminalia catappa* L.; presentaron CMI de 125 µg/mL, 250 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente, contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; y sus extractos hidroalcohólicos, CMI de 500 µg/mL, contra el mismo microorganismo.

Los extractos hidroalcohólicos de la corteza de *Juglans neotropica* Diels, de hojas de *Piper lineatum* Ruiz & Pav. y hojas de *Terminalia catappa* L.; presentaron CMI de 125 µg/mL, 250 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente, contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; y sus extractos hidroalcohólicos presentaron una CMI de 500 µg/mL contra el mismo microorganismo, a excepción del obtenido de *Piper lineatum* Ruiz & Pav. que presentó CMI de 250 µg/mL.

Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de hojas de *Terminalia catappa* L. presentaron una CMI > 2000 µg/mL, los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de corteza de *Juglans neotropica* Diels presentaron CMI de 2000 µg/mL, y los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de hojas de *Piper lineatum* presentaron una CMI de 500 µg/mL frente a biopelículas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes.

Los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Terminalia catappa* L. presentaron CMI de 2000 µg/mL y los de la corteza de *Juglans neotropica* Diels CMI de 1000 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente; y los de las hojas de *Piper lineatum* Ruiz & Pav. mostraron CMI de 250 µg/mL y de 500 µg/mL, respectivamente, frente a biopelículas de *Staphylococcus epidermidis* meticilino resistentes.

Agradecimiento: Proyecto financiado por el VRI-UNMSM, código de proyecto N° 120403061.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 167-93.
2. Agarwal A, Singh KP, Jain A. Medical significance and management of staphylococcal biofilm. FEMS Immunol Med Microbiol 2010; 58(2): 147-60.
3. Desmachelier C, Witting F. Sesenta plantas medicinales de la Amazonía Peruana. Ecología, Etnomedicina y Bioactividad. Gráfica Bellido SRL. Lima, 2000.
4. Macbride JF. Juglandaceae, Flora of Perú Field Museum of Natural History, Botanical Series Collation 1943; 13(2/2): 263-6.
5. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol 2008; 118(3): 418-28.
6. Brack Egg A. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco, 1999.
7. Marçal FJ, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Activity of the extracts and neolignans from *Piper regnellii* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Molecules 2010; 24; 15(4): 2060-9.
8. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. J Ethnopharmacol 2005; 99(2): 309-12.

9. Ruiz J, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-orienté peruano. *Ciencia e Investigación* 2009; 12(1): 41-7.
10. Nostro A, Germanò MP, D'angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 2000; 30(5): 379-84.
11. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42(4): 321-4.
12. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007; 42(4): 325-9.
13. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989; 42(8): 872-4.
14. Antunes AL, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CC, Perez LR, Macedo AJ, *et al.* Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in staphylococci. *APMIS* 2010; 118(11): 873-7.
15. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(7): 1027-31.
16. Lopez A, Hudson JB, Towers GH. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2001; 77(2-3):189-96.
17. Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, *et al.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine* 2012; 19(13): 1185-90.
18. Oliveira I, Sousa A, Ferreira IC, Bento A, Estevinho L, Pereira JA. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(7): 2326-31.
19. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol* 2011; 49(4): 396-402.
20. De la Cruz J. Actividad antimicrobiana, antioxidante y determinación de la composición química mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) de los aceites esenciales de 3 especies de piper nativas del Perú. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, 2012.
21. Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DA. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallidum* (C. DC.) Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(8): 1115-20.
22. Shinde SL, Junne SB, Wadje SS. The diversity of antibacterial compounds of *Terminalia* species (Combretaceae). *Pak J Biol Sci* 2009; 12(22):1483-6.
23. Aqil F, Ahmad I. Antibacterial properties of traditionally used indian medicinal plants. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007; 29(2): 79-92.
24. Tabopda TK, Ngoupayo J, Khan Tanoli SA, Mitaine-Offer AC, Ngadjui BT, Ali MS, *et al.* Antimicrobial pentacyclic triterpenoids from *Terminalia superba*. *Planta Med* 2009; 75(5): 522-7.

Correspondencia

Nombre: Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
 Dirección: Jr. Puno 1002 -Lima 1 - Perú
 E-mail: julioruizquiroz@gmail.com