

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Estudio químico preliminar y evaluación de la
capacidad antibacteriana de los metabolitos
secundarios producidos por los hongos endofíticos
aislados de *Piper elongatum* "matico" Ayacucho -
2013**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por:

Bach. LA TORRE TORRES Luis Gonzalo

AYACUCHO - PERÚ

2014

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

R.D. 208 – 2014 – UNSCH – FCB –D

Bach. Luis Gonzalo LA TORRE TORRES

En la ciudad de Ayacucho, a los diecinueve días del mes de diciembre del dos mil catorce, reunidos en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas, siendo las cuatro de la tarde con cuatro minutos, para recepcionar el acto de sustentación del Bach. Luis Gonzalo LA TORRE TORRES, bajo la presidencia del Dr. S. Tomás Castro Carranza, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y conformada por el Dr. Víctor H. Alegría Valeriano, Dr. Edwin C. Enciso Roca, Dr. Saúl A. ChuchónMartínez, y la Blga. Sonia H. palomino Felices, asesora, quien además actúa como secretaria Docente (a) a mérito de la R.D. No 204 – 2014 – UNSCH – FCB – D, para recepcionar el trabajo de tesis titulado: “Estudio químico preliminar y evaluación de la capacidad antibacteriana de los metabolitos secundarios producidos por los hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* “matico” Ayacucho 2013. Trabajo de investigación con el cual el tesista pretende obtener el título profesional de Biólogo con mención en la Especialidad de Biotecnología.

El señor decano dio por iniciado el acto de sustentación dando cuenta de toda la documentación existente y que respalden el presente acto académico e inmediatamente invito al Sr. Sustentante a iniciar su exposición y defensa de su trabajo de investigación con miras a su titulación, mencionándole que dispone de un tiempo máximo de cuarenta y cinco minutos por lo cual puede hacer uso de los recursos tecnológicos necesarios de acuerdo al reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de formación profesional de Biología.

El señor sustentante Luis G. La Torre Torres, inicio su exposición dando de los fundamentos que permitieron el desarrollo de la presente investigación, posteriormente dio a conocer los resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones a las que arribaron producto de la tesis.

Finalizando la exposición de trabajo de investigación, el señor Decano, invito a los miembros del jurado a realizar las preguntas que consideren pertinentes a fin de mejorar y/o aclarar la redacción del trabajo de tesis y permitir que el sustentante realice la defensa de su trabajo de investigación. Finalmente el Decano invito al público asistente a abandonar el Auditorium de la Facultad, a fin de permitir deliberar la calificación de la tesis por parte de los miembros del jurado, cuyas calificaciones fueron las siguientes:


MIEMBRO EVALUADOR	EXPOSICIÓN	RPTA.	PREG.	PROMEDIO
Dr. S. Tomás Castro Carranza	18		16	17
Dr. Víctor H. Alegría Valeriano	17		16	17
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17		17	17
Blga. Sonia H. Palomino Felices	18		18	18
Dr. Saúl A. Chuchón Martínez	17		16	17

Concluida la calificación se obtiene el promedio de Diecisiete (17) luego se invitó al sustentante y al público asistente y al Auditorium con la finalidad de dar a conocer el resultado a su vez colocar la medalla y tomar la juramentación respectiva.


Concluido con el acto de sustentación. Los miembros del jurado evaluador, firmamos al pie del presente documento, dando fe del mismo. Se finalizó el acto de sustentación siendo las seis con veinte de la tarde.



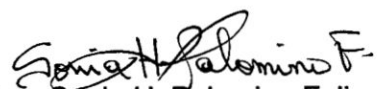
Dr. S. Tomás Castro Carranza
Presidente calificador



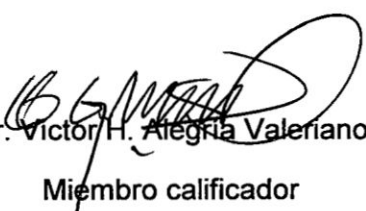
Dr. Edwin C. Enciso Roca
Miembro calificador



Dr. Saul A. Chuchón Martínez
Miembro calificador



Blga. Sonia H. Palomino Felices
Asesora- Secretaria Doc (e)



Dr. Víctor H. Alegria Valeriano
Miembro calificador

A Dios.
A mis padres: Gustavo Marino
y Concepción Lourdes.
A mis hermanos: Elsa, Olivia,
Abel, Carla y Pabel

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi querida *alma mater*. A los docentes del Departamento Académico de Ciencias Biológicas, quienes contribuyeron en mi formación académica y profesional.

A la Blga. Sonia Palomino Felices, asesora del presente trabajo, por brindarme su apoyo y la orientación acertada para el desarrollo del presente trabajo.

Un especial reconocimiento al Mg. Enrique Javier Aguilar Felices mi coasesor de la presente tesis por guiarme en el desarrollo del presente trabajo, quien tuvo la predisposición y paciencia de absolver mis dudas e inquietudes.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	xii
ÍNDICE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos botánicos	5
2.2.1. Clasificación sistemática de <i>Piper elongatum</i> "matico"	5
2.2.2. Descripción botánica	5
2.2.3. Distribución y hábitat	6
2.2.4. Usos medicinales	6
2.2.5. Componentes activos	7
2.3. Los hongos	7
2.4. Hongos endofíticos	9
2.5. Metabolito secundario	10
2.5.1. Metabolito secundario microbiano	11
2.5.2. Características del metabolismo secundario microbiano	11
2.5.3. Rutas metabólicas de los metabolitos secundarios	12
2.6. Fermentaciones	13
2.6.1. Fermentaciones microbianas	14
2.6.2. Requerimientos fisiológicos del crecimiento microbiano	14
2.6.3. Nutrientes requeridos para el crecimiento microbiano	15
2.6.4. Etapas para la obtención de un producto microbiano	16
2.7. Antagonismo microbiano	17
2.7.1. Mecanismo de acción	17
2.8. Otras definiciones	19
2.8.1. Bacterias patógenas	19
2.8.2. Principio activo	19

III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Localización de zona de estudios	21
3.2. Muestra y sistema de muestreo	21
3.3. Métodos para la recolección de datos	21
3.4. Análisis de datos	25
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Hongos endofíticos aislados de las hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico" en las cuatro zonas de muestreo.	30
Tabla 2 Frecuencia de géneros de hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico".	31
Tabla 3 Actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios de hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico" frente a las cepas de <i>Escherichia coli</i> INS-4672 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC- 6803.	32
Tabla 4 Compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina de los extractos de caldo líquido producidos por tres cepas de hongos endofíticos aislados a partir de las hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico".	33
Tabla 5 Metabolitos secundarios del extracto de caldo producidos por el hongo endofíticos del género E4APP3 (<i>Penicillium</i>) aislado de <i>Piper elongatum</i> "matico". Ayacucho.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Relación entre las dos fases de crecimiento	12
Figura 2 Interconexión existente entre el metabolismo primario y secundario.	13

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Flujograma del aislamiento e identificación de hongos endofíticos de las hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico".	54
Anexo 2	Crecimiento de las colonias de hongos endofíticos aislados de las hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico".	55
Anexo 3	Observación microscópicas de hongos endofíticos aislados de las hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico".	56
Anexo 4	Flujograma para la producción y separación de metabolitos secundarios de los hongos endofíticos aislados de las hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico".	57
Anexo 5	Flujograma de la actividad antibacteriana de los discos con metabolitos secundarios de hongos endofíticos.	58
Anexo 6	Formación de halos de inhibición de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos frente a bacterias patógenas, prueba de difusión en discos.	59
Anexo 7	Tamizaje fitoquímico según el modelo de Miranda	60
Anexo 8	Fermentaciones (a) y formación de conidios (b) de hongos endofíticos, aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico" con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas	61
Anexo 9	Comparación de las cepas bacterianas con la escala de Mac Farland.	62
Anexo 10	Muestra de controles (a) y metabolitos (b), utilizados para la prueba de difusión de discos.	63
Anexo 11	Concentración en rotavapor para extracción de metabolito en AcOEt.	64
Anexo 12	Sistema de solvente butanol ácido acético glacial agua (4:5:1) (a), Inyección de los metabolitos sobre cromatografía de capa fina silica gel G 60 en soporte de aluminio (b), Separación de los metabolitos utilizando BAW como sistema de solvente (c) realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de ciencias Biológicas.	65

Anexo 13	Observación en lámpara UV de la separación de los compuestos utilizando BAW como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas.	66
Anexo 14	Observación en lámpara UV de la separación de los compuestos utilizando CHCl_3CHOH como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas.	67
Anexo 15	Observación del revelado con vainillina sulfúrico de la separación de los compuestos utilizando CHCl_3CHOH como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas.	68
Anexo 16	Curva espectral en la banda de luz ultra violeta de los compuestos separados por cromatografía.	69
Anexo 17	Número de colonias y géneros de hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico".	72
Anexo 18	Porcentajes de aislamientos de hongos endofíticos en función de los números de muestreos realizados a la planta del <i>Piper elongatum</i> "matico" Ayacucho, 2013-2014.	73
Anexo 19	Número de cepas de hongos endofíticos aislados a partir de hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico" en función al tipo de medio de cultivo utilizado. Ayacucho, 2013-2014.	74
Anexo 20	Composición del medio de cultivo sulfato de amonio	75
Anexo 21	<i>Piper elongatum</i> "matico" Ayacucho 2013.	76
Anexo 22	Certificado de la identificación taxonómica de <i>Piper elongatum</i> "matico"	77
Anexo 23	Matriz de consistencia	78

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal, realizar el estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos aislados de las hojas de *Piper elongatum* "matico" y evaluar su actividad antibacteriana. La investigación es de tipo básica, nivel descriptivo y diseño transversal. La investigación se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La toma de muestras se realizó recolectando las hojas de *Piper elongatum* "matico" de los jardines de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, las mismas que fueron desinfectadas con alcohol al 70% y lejía al 3,5%, sembrados en agar papa dextrosa y agar Sabouraud e incubados a 25°C por 7 días, las colonias de hongos, fueron identificadas mediante sus características macroscópicas y microscópicas. Se realizaron las fermentaciones en 100 ml de caldo de cultivo papa glucosa sulfato de amonio, a 25°C/ 15 días en agitador horizontal, para la producción de metabolitos secundarios. A los metabolitos producidos por fermentación se les realizaron pruebas para determinar su actividad antibacteriana frente a bacterias patógenas, *Escherichia coli* INS- 4672 y *Staphylococcus aureus* ATCC- 6538. A partir del caldo fermentado se realizaron las extracciones de los metabolitos con AcOEt, concentrados en rotavapor y separados con CCF utilizando dos tipos de solvente, CH₃Cl-CHOH y BAW los que fueron leídos con luz ultravioleta (CAMAG 366-254 nm) y leídos con espectrofotómetro a una longitud de onda de 200-500 nm revelados con vainillina sulfúrico y un tamizaje químico. Encontrándose que a partir de *Piper Elongatum* "matico" se aislaron 69 cepas fúngicas de los géneros *Alternaria*, con 44 cepas, *Penicillium*, con 22 cepas, *Aspergillus* con 3 cepas y 10 cepas no identificadas, de los cuales mostraron actividad antibacteriana los metabolitos producidos por 3 cepas de los géneros *Penicillium* (E4APP3), *Alternaria* (E4SA5) y *Aspergillus* (E4SX2) frente a *Escherichia coli* INS- 4672 y *Staphylococcus aureus* ATCC- 6538. Se identificó 8 compuestos químicos para *Penicillium*, 6 compuestos de *Alternaria* y 4 compuestos de *Aspergillus*, identificándose estos como; terpenos, sesquiterpenos, azúcares reductores, glicosidos cardiotónicos, triterpenos esteroideos, compuestos saturados. Se concluye que a partir de hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico" se pudo encontrar metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

Palabras clave: hongo endofítico, metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y *Piper elongatum* "matico"

I. INTRODUCCIÓN

Los organismos endófitos; bacterias, actinomicetos, levaduras y hongos filamentosos, han recibido una creciente atención en los años recientes. Estos microorganismos viven asintómicamente dentro de tejidos vegetales sanos, los que, durante parte o todo el ciclo de vida se establecen en los tejidos vegetales, y se ha demostrado que poseen un gran potencial económico en áreas como la medicina, agricultura, entre otras.

Por esta razón la búsqueda, explotación de los metabolitos y de sus propiedades a partir de microorganismos endófitos de plantas medicinales son de interés continuo en la investigación biotecnológica.¹

Las evidencias disponibles indican que el descubrimiento de nuevos productos naturales se ha incrementado como consecuencia de la aplicación de estrategias de búsqueda y de procesos microbiológicos innovadores. El conocimiento de las diversas rutas biosintéticas en plantas, hongos y bacterias han proporcionado una amplia variedad de sistemas que se pueden usar en la producción de fármacos y otros metabolitos de interés. Los microorganismos y en especial los hongos, constituyen dentro de las fuentes de productos naturales una de las menos estudiadas, que sin embargo, ofrece grandes posibilidades para la obtención de nuevos metabolitos con actividades biológicas potentes.² Ante el aumento de resistencia por parte de bacterias patógenas en el tratamiento tradicional, se ha visto la necesidad del uso de sustancias terapéuticas combinadas, en la que se emplea más de un antibacteriano para lograr el objetivo, de esta manera se aumenta los problemas de toxicidad que acompañan al tratamiento; situación que se agrava si se trata de un paciente inmunosuprimido.³

En la presente investigación se realizó un estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios de hongos endófitos aislados de *Piper elongatum*

“matico” y se evaluó la capacidad antibacteriana de éstos. El trabajo se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, considerándose una investigación básica, de nivel descriptivo, con diseño transversal analítico en condiciones de laboratorio que forma parte esencial para el desarrollo de posteriores proyectos para encontrar nuevos metabolitos aplicados al campo de la salud, agricultura entre otras sustancias, producidos por hongos endofíticos de *Piper elongatum* “matico”. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se plantearon:

Objetivo general

- Realizar el estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos de *Piper elongatum* “matico”.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar hongos endofíticos de *Piper elongatum* “matico”.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofitos aislados de *Piper elongatum* “matico” frente a bacterias patógenas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Bacon *et al.*,⁴ en la investigación realizada sobre metabolitos fúngicos con potencial biotecnológico menciona que son muchos los hongos endofíticos que todavía no se conocen, así como los metabolitos producidos por éstos, sin embargo describe que los compuestos descritos hasta el momento son; toxinas, agentes fungicidas y bacteriocidas, sustancias importantes asociadas a tratamientos antitumorales, antivirales, entre otras.

Poca sangre *et al.*,⁵ en la investigación realizada en hongos endofíticos como manejo alternativo de fitonematodos en banano, lograron aislar hongos para ser usados para el control de agentes biológicos de fitonematodos, *Radopholus similis* del banano en fincas del Brasil, llegando a la conclusión de que las plantas protegidas con hongos endofíticos presentan mejor sanidad vegetal.

Barrios,⁶ en la investigación realizada en Costa Rica sobre hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en plátano, señala las alternativas de control de la enfermedad producida por este hongo se realiza mediante el uso de hongos endofíticos los cuales son promotores de crecimiento e inductores de resistencia.

Chávez,⁷ en la investigación realizada, utilizando hongos y bacterias endofíticos en el control biológico del nemátodo barredor *Radopholus similis* en Costa Rica, llegó a la conclusión de que plantas protegidas con hongos y bacterias endofíticos presentan mejor sanidad vegetal.

Ramírez *et al.*,⁸ mediante la investigación sobre la actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador, sobre bacterias patógenas, aisladas de las hojas de plantas de los géneros *Baccharis*, *Piper*, *Borreira*, *Chuquiragua* y *Bidentifolia*. Encontraron que, las taxas fúngicas más frecuentes fueron: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Nigrospora*, las

que fueron evaluadas en la actividad antagónica frente a bacterias patógenas. La mayoría de las cepas fúngicas estudiadas (56,3%) presentaron actividad, los mejores resultados se evidenciaron en un aislado de hongo de *Mycelia sterilia*.

Makowiecky,⁹ en la universidad de Brasil investigó a la comunidad de hongos endofíticos como: *Cladosporium*, *Epicocum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis* e *Xilaria*, asociada a la "caña de azúcar" convencional y genéticamente modificada llegando a la conclusión que tienen actividad frente a fitonematodos y presentan una mejor sanidad.

Sayuri,¹⁰ en la Universidad de Sao Paulo (Brasil) trabajo en la diversidad y el potencial biotecnológico de los hongos endofíticos del "cacao" *Theobroma cacao* como: controlador biológico de *Crinipellis pernicioso* aislado de cepas fúngicas como *Fusarium*, *Gibberella*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Verticillum*.

Chapaval,¹¹ trabajó en Floresta, Brasil, en el aislamiento de hongos endofíticos a partir de las hojas de "hierba-mate" *Ilex paraguariensis* nativas y cultivadas, obteniendo resultados de la existencia de una gran diversidad fúngica en hojas adultas en comparación a las hojas jóvenes, del mismo modo existe gran diversidad de hongos endofíticos en las hojas de la "hierba-mate" nativas en comparación a las que son cultivadas, entre los hongos endofíticos destacan los géneros: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillum* y trece hongos aún no identificados.

Castillo *et al*,¹² en la investigación realizada sobre seguridad y toxicidad de fármacos fúngicos publican que, los problemas de seguridad y toxicidad de los fármacos antifúngicos o de aparición de resistencias microbiológicas hacen imprescindible el desarrollo de nuevos y mejores antibióticos y antimicóticos que aporten unas ventajas apreciables respecto a los existentes.

Arnold *et al*,¹³ aislaron 418 morfo especies de endofíticos (aproximadamente 347 taxa genéticamente distintas) de 83 hojas sanas de *Heisteria concinna* y *Ouratealucens* en la tierra del bosque tropical de Panamá y planteó la posibilidad que los mismos endófitos tropicales pudieran ser diversos.

Schwarz *et al*,¹⁴ en el trabajo realizado sobre el acido-3-hidroxiopropionico como nematocida concluyen que, los hongos endofíticos producen sustancias con propiedades farmacológicas muy importantes, que abarcan un amplio espectro de actividades funcionales, que han dado un resultado prometedor en

el tratamiento clínico de una serie de patologías a nivel humano y animal e incluso ofreciendo la posibilidad de aplicaciones agrícolas potenciales.

Sohrab, ¹⁵ en su trabajo sobre aislamiento y descripción de estructuras de metabolitos secundarios de hongos endofíticos publica que los hongos endofíticos se ven como una excelente fuente de productos naturales bioactivos, que inhiben o matan una amplia variedad de microorganismos, como las bacterias, hongos, virus y protozoarios que afectan a humanos y animales, además de proporcionar a las plantas protección contra fitopatógenos.

Salgado *et al.* ¹⁶ en su trabajo sobre aislamiento de hongos endofíticos de rosas manifiestan que en algunos casos, los hongos endofíticos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos; utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y está se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen.

Trigos *et al.*, ¹⁷ en el trabajo sobre la evaluación antibacteriano de hongos microscópicos de suelo y restos vegetales concluye que los principios activos ocupan un lugar importante dentro de los recursos terapéuticos; así mismo estas sustancias se utilizan ampliamente para tratar enfermedades bacterianas en plantas y animales.

2.2. Aspectos botánicos

2.2.1. Clasificación Sistemática de *Piper elongatum* “matico”

Determinado en el Herbarium Huamanguensis de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. (Blga. Laura Aucasime Medina) y es como sigue:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Magnolidae
Orden	: Piperales
Familia	: Piperaceae
Género	: Piper
Especie	: <i>Piper elongatum</i>
Nombre Vulgar	: “matico”, “cardoncillo”, “yerba del soldado”.

2.2.2. Descripción botánica:

El “matico” es una planta arbórea iberoamericana que alcanza de 2 a 3 metros de alto de ramas articuladas, hojas cortante pecioladas oblongas, agudas,

nerviadas, irregularmente redondeadas en la base, ásperas en el haz, algo pubescentes en el envés, de flores bisexuales aclamídeas o desnudas protegidas únicamente por una pequeña bráctea y dispuestas en espiga densas terminales, androceo, formado por 2 estambres, gineceo de ovario súpero, unilocular, con un sólo óvulo ortótropo, fruto baya drupiforme, las semillas poseen perispermo y endospermo con un embrión muy pequeño. En todos los órganos de esta planta se encuentran células oleicas ricas en aceites que se emplean en la medicina tradicional, esta planta se propaga mediante semillas.

2.2.3. Distribución y hábitat

El “matico” es común en muchas partes de América tropical y especialmente en el Perú y Ecuador de donde es oriundo, *Piper elongatum* “matico”. Crece en la sierra baja abrigada, valles interandinos, valles cálidos generalmente se encuentra en huertos, bordes de acequias y caminos, entre 2 600 a 2 700 msnm, que se encuentran en los departamentos de Cajamarca, Junín, Lima, Cusco y Ayacucho. En el Departamento de Ayacucho se encuentra distribuido en la provincia de La Mar, Huanta y Huamanga.¹⁸

El nombre clásico para el género, provino originalmente del Pipali de Sanscrit “matico” es el nombre de soldado que accidentalmente descubrió las propiedades de las hojas cuando sufrió heridas luego de una batalla en el Perú. Esta planta crece como silvestre en muchos lugares del Perú, siendo aprovechado por menos del 5% de la población, por desconocimiento de sus propiedades medicinales o simplemente, falta de costumbre o por no tener confianza en la planta natural y tener preferencia por los productos ya elaborados naturales o sintéticos. Esta idiosincrasia popular ha orientado a pequeños inversionistas y científicos a preparar productos a base de esta planta. Un ejemplo es el jabón antiséptico de matico. El género *Piper* abarca mil especies propias del trópico del Perú se conocen 531.¹⁸

2.2.4. Usos medicinales

Su principal propiedad medicinal es la de ayudar a la cicatrización en todo tipo de heridas, ya sea externas o internas, las hojas se preparan en cocimiento como carminativo en lavados vaginales, también en forma de infusión o de cocción se usan vía oral para tratar afecciones digestivas como anti ulcerosas. Las hojas en infusión aplicadas directamente sobre la zona dañada en forma de

emplasto como un poderoso analgésico y antiinflamatorio. Las hojas tiernas machacadas se utilizan por vía oral como astringente y tónico. El uso en baños se preconiza en las hemorroides, trastornos reumáticos y para el tratamiento de las úlceras. La infusión acuosa al 15% de estas hojas frescas machacadas se aplica en las heridas menores picaduras de insectos o mordida de sanguijuelas, sirve como enjuague bucal, astringente, útil para áreas inflamadas de la piel. Las hojas secas actúan como un poderoso hemostático. Su acción sobre la mucosa gastrointestinal es tónica, estimulante; si se toma en exceso puede ser irritante y producir perturbaciones digestivas. Puesto en contacto con heridas o llagas recientes, disminuye y detiene los derrames sanguíneos y acelera la cicatrización. Sobre las mucosas ejerce una acción constructiva muy favorable para curación de flujos o hipersecreciones crónicas, cura llagas y heridas de la nariz, encías. Es aconsejado en úlceras sencillas del estómago y cáncer de este órgano.¹⁹

2.2.5. Componentes activos:

La popularidad de esta planta no trascendió fuera de nuestro país, por lo que la información química y farmacológica existente, es casi exclusivamente de origen nacional. La familia Piperáceas, contiene: aceites etéreos, amidas picantes, mono y sesquiterpenos, fenilpropanoides, pirones, polifenoles y lignanos, alcaloídes, ésteres, ésteres fenólicos, alcaloídes, pirrolidínicos y esencias.²⁰

El componente más importante, al cual se le atribuyen las virtudes vulnerarias, es el tanino. Contiene taninos (5,7%), además de alcaloídes y numerosos glucósidos especialmente del tipo flavonoides. En las flores se encuentra acaetina-7-a-rutinósido, apigenina-7-0 glucósido; quercitina-3-0- rutinósido, mientras que en las hojas: luteolina-7-0-glucósido e hidroxiluteolina-7-0-glucósido.¹⁹

2.3. Los hongos

Constituyen un grupo muy numeroso de organismos que presentan una amplia distribución en la naturaleza, contribuyendo a la descomposición de la materia orgánica y participando en los ciclos biológicos; un pequeño número son patógenos de animales y plantas. Son organismos eucariotas típicos y poseen un núcleo que contiene varios cromosomas delimitado por una membrana nuclear, con nucléolo rico en ARN y orgánulos citoplasmáticos como;

mitocondrias, vacuolas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y ribosomas 80S. El citoplasma se encuentra limitado por la membrana citoplasmática, que es una doble capa de lípidos que contiene proteínas y esteroides y que controla la permeabilidad celular y participa en la síntesis de la pared celular.²¹

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriformes. Los hongos filamentosos (miceliales o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos.²²

Los hongos obtienen los nutrientes por absorción y tienen un metabolismo quimioheterótrofo, ya que obtienen la energía y el carbono de compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Este hecho condiciona su modo de vida, ya que en la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica en descomposición, participando en los ciclos naturales de reciclado del carbono y otros elementos naturales o como patógenos oportunistas de los animales y plantas. Los hongos pueden degradar una gran cantidad de componentes, para lo que disponen de potentes exoenzimas que en algunos casos pueden servirles como factores de virulencia en el hospedador.²²

La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente. En un grupo importante de hongos solamente se conoce la reproducción asexual, porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque esta se ha perdido a lo largo de la evolución. La reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia. Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se producen tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica, ya que presentan diferentes características. Los hongos del Phylum *Basidiomycota* producen basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los *Ascomycota* producen ascosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada asco y los *Zygomycota* producen zigosporas.²²

Las esporas asexuales generalmente se producen en hifas especializadas y se denominan de diferente forma según su morfología; los *Zygomycota* producen esporangiosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada esporangio; los *Ascomycota* y en menor grado los *Basidiomycota*, producen esporas asexuales denominadas conidios que se desarrollan a partir de una estructura denominada conidióforo. Según su tamaño se diferencian en microconidios y macroconidios.²²

En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo, necesitando una fuente de carbono orgánica e iones amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno. Esta facilidad para crecer en cualquier medio de cultivo y la presencia de conidios en el aire hace que sean contaminantes habituales en el laboratorio, los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes, anaerobios facultativos. Sus requerimientos de temperatura y de pH son poco exigentes y la mayoría crecen en un rango de pH de 2 a 9 y a temperaturas entre 10 y 40 °C. Las células fúngicas se observan bien por microscopía convencional, aunque pueden requerir tinciones especiales para facilitar su visualización.²²

2.4. Hongos endofíticos

Los hongos endofíticos forman parte de la microbiota del suelo y el aire, interactúan con la planta y se definen como organismos no patogénicos, los cuales durante algún momento de su ciclo de vida colonizan o no los tejidos internos en la planta sin causar ningún tipo de síntoma.²³

Los hongos endofíticos son organismos que viven en asociación con plantas, se encuentran en las hojas y en los tallos de muchas plantas. Son simbioses, no producen síntomas de enfermedad en la planta, aunque algunas veces pueden presentar un grado de patogenicidad leve estando relacionados taxonómicamente con los hongos fitopatógenos. Viven en los espacios intercelulares y algunas veces intracelularmente en hojas, tallos y flores, absorbiendo nutrientes de la planta. En algunos casos, los hongos endofíticos confieren beneficios a la planta que pueden resultar mutuos; utilizan los nutrientes que sintetiza la planta y esta se beneficia de los metabolitos bioactivos que ellos producen.²⁴

Casi todas las especies de plantas vasculares revisadas hasta la fecha se encuentran como refugio a bacterias y/o hongos endofitos. Además, la

colonización de endofíticos en algas marinas, musgos y helechos también ha sido registrada, en realidad los endófitos son componentes importantes de la biodiversidad microbiana. Comúnmente, los varios de cientos de especies de endófitos pueden ser aislados de una sola planta, al menos una especie exhibe especificidad por el hospedero. Las condiciones ambientales bajo las que el huésped está creciendo también afectan a la población de endofíticos y el perfil del endófito puede ser más diversificado en áreas tropicales. Estos hongos promueven el crecimiento, mejoran la capacidad de adaptación ecológica del huésped aumentando su tolerancia estrés (biótico y abiótico) e incrementan la resistencia a enfermedades y plagas.²⁵

Las plantas infectadas con endofíticos crecen a menudo más rápido que las plantas no infectadas. Este efecto es por lo menos en parte a los endofíticos debido a la producción de fitohormonas como indole-3-ácido acético (IAA), citoquininas y otras sustancias promotoras del crecimiento de las planta y/o en parte debido al hecho de que los endofíticos podrían aumentar el consumo de elementos nutritivos como nitrógeno y fósforo de los huéspedes.²⁶

La promoción de crecimiento se atribuye a ciertos grupos de microorganismos, capaces de producir compuestos químicos (antibióticos y/o metabolitos secundarios), grupos ciano (HCN supresor de bacterias patógenas), sideroforos, quelatantes de hierro y hormonas reguladoras de crecimiento, tales como; auxinas, citoquininas, ácido giberélico, ácido absísico etileno, entre otros. En algunos casos esta promoción de crecimiento resulta como consecuencia de la reducción de microorganismos patógenos mediante un modo de acción antagónico contra el agente causal, dando como resultado un efecto positivo en el crecimiento de la planta.²⁷

Los endofíticos se encuentran en todas las plantas, son sumamente abundantes y son a menudo muy diversos. La mayoría de estos endófitos constituyen infecciones internas localizadas en follaje, raíces, tallos y corteza son transmitidos horizontalmente vía esporas, una fracción mucho más pequeña es transmitida verticalmente vía crecimiento en semillas.²⁸

2.5. Metabolismo secundario

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la

ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.²⁹

2.5.1. Metabolismo secundario microbiano

Los metabolitos secundarios de los Hongos endofíticos son compuestos que poseen estructura química muy diferente a la de los metabolitos primarios, como: azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento en el cultivo de producción, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia en la naturaleza. Estos metabolitos secundarios, en contraste a la naturaleza general de los metabolitos primarios, son producidos por especies de un género y para algunas especies por determinadas cepas, únicamente. Muchos de los microorganismos que producen metabolitos secundarios poseen una compleja diferenciación morfológica.²⁹

En el caso de los microorganismos, los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos. En la trofofase fase de crecimiento de los microorganismos no se producen metabolitos secundarios; es en la idiofase, fase en la que el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo, es cuando normalmente se producen. Para que se produzca el metabolito secundario, primero hay que asegurar unas condiciones óptimas durante la trofofase. Como mecanismo de defensa, la producción de metabolitos secundarios no se produce inmediatamente después de la conclusión de la trofofase. Primero, al comienzo de la idiofase, deben hacerse resistentes a sus propios antibióticos.²⁹

No se conocen bien los factores que disparan la producción de metabolitos secundarios. Se sabe que el paso de trofofase a idiofase se produce cuando algún nutriente del medio es limitante. Suele tratarse de C, N o P. Al faltar algunos de estos factores, se altera la producción de metabolitos primarios y se originan inductores de enzimas que darán lugar a metabolitos secundarios.²⁹

2.5.2. Características del metabolismo secundario microbiano

La actividad metabólica microbiana no tiene siempre como consecuencia la proliferación celular. Si se considera la actividad metabólica de un cultivo microbiano a lo largo de toda la curva de crecimiento, se diferencian aquellos procesos metabólicos asociados al crecimiento celular (metabolismo primario) de aquellos que tienen lugar en la fase estacionaria, una vez que ha cesado el crecimiento de la biomasa (metabolismo secundario). Como resultado del

metabolismo secundario se producen diferentes tipos de compuestos que reciben, todos ellos, la denominación de metabolitos secundarios.²⁹

En el crecimiento no balanceado, el aumento no balanceado, el aumento del número de células puede tener lugar en una o dos fases. En el primer caso, tenemos unas curvas de aumento de la biomasa y del crecimiento del número de bacterias como se representa en (a) y en el segundo, como en (b) de la figura 1.

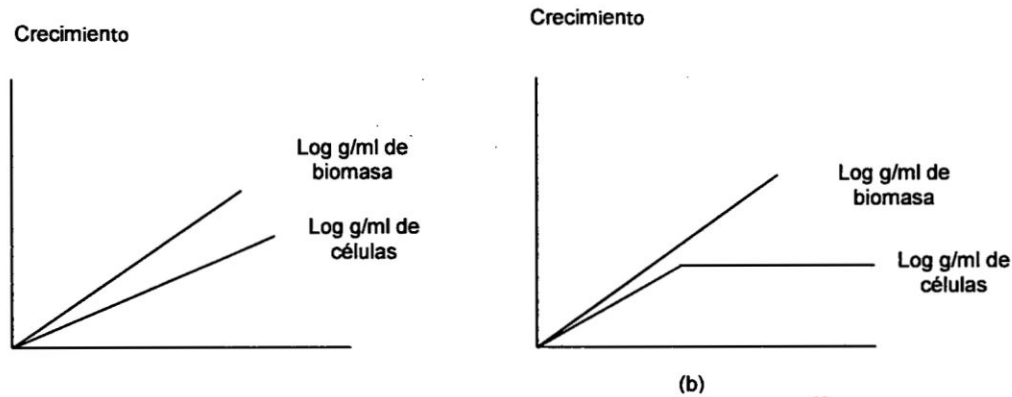


Figura 1. Relación entre las dos fases de crecimiento²⁹

Esto permite distinguir dos fases de crecimiento; la trofofase (proliferación celular) y la idiofase (no proliferación celular). El diagrama (a) puede corresponder a una trofofase superpuesta a la idiofase. Cuando son sucesivas, como en (b), la actividad metabólica no participa directamente en el desarrollo celular. El acúmulo de reservas suele tener lugar de conformidad con el diagrama (a), pero pueden ser reutilizadas después del agotamiento del sustrato exterior. En cambio, (b) puede representar formación de polisacáridos extracelulares que se arrastran con las células, pero que pueden luego separarse por lavado. Otros casos como el del diagrama (b), o intermedios entre (a) y (b), pueden ser a diferenciación celular o producción de pigmentos.²⁹

2.5.3. Rutas metabólicas de los metabolitos secundarios

En la figura 2, se muestra la interconexión que existe entre el metabolismo primario y secundario, en este caso los metabolitos secundarios se dividen a grandes rasgos y considerando únicamente los grupos de mayor importancia en tres grupos; compuestos terpénicos, fenólicos y compuestos con nitrógeno.²⁹

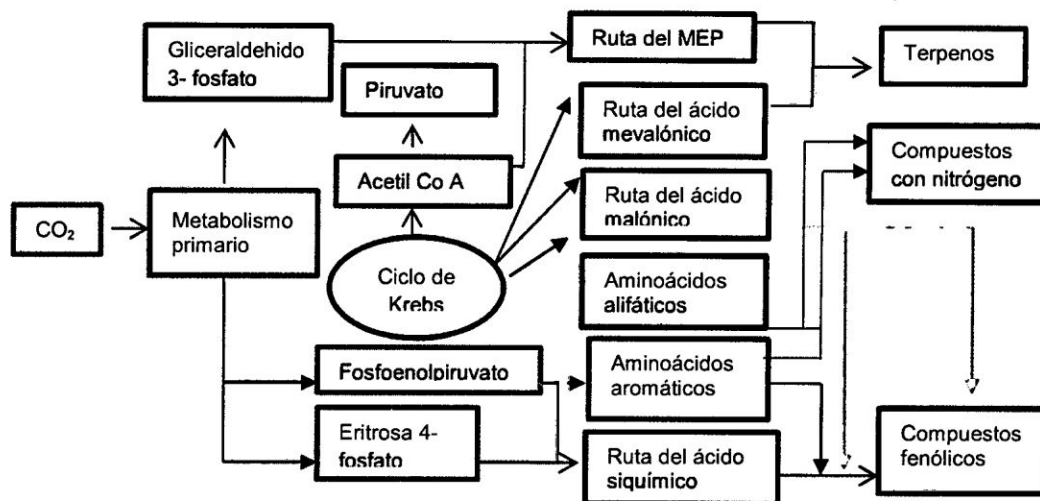


Figura 2. Interconexión existente entre el metabolismo primario y secundario.²⁹

En la misma figura también puede distinguirse; la rutas: ruta del MEP (metil eritritol fosfato), ruta del MVA (ácido mevalónico), ruta del ácido malónico y la ruta del ácido siquímico. Es igual de importante la participación de aminoácidos tanto alifáticos como aromáticos, ya que son la fuente biosintética principal de nitrógeno. Cada una de estas vías está relacionada de la siguiente manera con el metabolismo primario: La ruta del ácido siquímico, es originada por el fosfoenol piruvato y la eritrosa-4-fosfato, a su vez este ácido es precursor de los aminoácidos aromáticos; la ruta MEP se origina del piruvato y del gliceraldehído-3-fosfato; los aminoácidos alifáticos son obtenidos a partir del ciclo de Krebs (ciclo del ácido cítrico); Las rutas malónica y mevalónica, a partir de la Acetil-CoA y la ruta MEP se origina del piruvato y del gliceraldehído-3-fosfato.²⁹

Las relaciones existentes entre estas rutas y los grupos de metabolitos secundarios son las siguientes; los compuesto terpenoides se biosintetizan por las rutas MEP o MVA, los compuestos fenólicos por la ruta del ácido siquímico, a partir de los aminoácidos al actuar solas o combinadas de las siguientes maneras; ruta del ácido siquímico-aminoácidos aromáticos, ruta ácido malónico y los compuestos de nitrógeno fundamentalmente provienen de los aminoácidos aromáticos y/o alifáticos.²⁹

2.6. Fermentaciones

La fermentaciones, se pueden definir en sentido estricto como procesos metabólicos donde el oxígeno no se utiliza como aceptor final de la cadena de

transporte electrónica, por lo tanto, un sustrato orgánico se utiliza generalmente como aceptor final, llevando a la acumulación de moléculas reducidas, tales como lactato, etanol u otras moléculas simples. Más ampliamente, una definición general de fermentación es "un proceso productivo que supone la utilización de células (microbianas)".³⁰

2.6.1. Fermentación microbiana

Un proceso de fermentación se lleva a cabo en un fermentador o biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos.³⁰

2.6.2. Requerimientos fisiológicos del crecimiento microbiano en las fermentaciones

a) Medio acuoso

Todas las reacciones biológicas se realizan en presencia de agua. Esta última es por lo general el principal componente del medio de cultivo. Incluso aquellos microorganismos que crecen en un medio sólido como granos de cereales, pajas o heno, necesitan que estos sustratos estén humedecidos para poder colonizarlos.³¹

b) Temperatura de crecimiento

Las temperaturas entre las cuales se puede desarrollar una célula microbiana varían entre 10 y 60 °C. Según el rango de temperatura en el cual el crecimiento es posible podemos distinguir microorganismos psicrófilos (4-25 °C), mesófilos (30-40 °C) y termófilos (40-65 °C y más).³¹

c) Acidez

El pH de crecimiento de los microorganismos varía entre 3,0 y 8,0. En forma general, las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 7,0) con la importante excepción de las bacterias lácticas que resisten pH ácidos. Por el contrario, la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras prefieren pH ácidos

(alrededor de 5,0). Este ácido tolerancia otorga una ventaja importante a las fermentaciones con hongos, ya que el riesgo de contaminación es baja.³¹

d) Presión parcial de oxígeno

Se distinguen dos tipos de microorganismos en función de su requerimiento en oxígeno, los microorganismos aerobios, para los cuales la disponibilidad del oxígeno es indispensable y los microorganismos anaerobios, para los cuales el oxígeno es tóxico. Existen por último algunos microorganismos capaces de adaptar su metabolismo a las condiciones de oxigenación imperantes en el medio y que son por lo tanto aerobios facultativos (este es el caso de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros).³¹

2.6.3. Nutrientes requeridos para el crecimiento de microorganismos en un fermentador

En primer lugar, el microorganismo requiere de una fuente de carbono de la cual extrae la energía necesaria para su metabolismo. Las fuentes de carbono más comunes son los hidratos de carbono, tales como almidón y azúcares. En la búsqueda de nuevas fuentes de carbono se está estudiando desde hace poco la utilización de recursos lignocelulosicos (pajas de cereales, árboles y sus residuos, etc.), principal fuente de biomasa renovable.³¹

Muchas de estas fuentes de carbono requieren un pre tratamiento previo a su utilización; es el caso, por ejemplo; el almidón, que debe ser cocido e hidrolizado hasta glucosa antes de ser transformado en etanol por los microorganismos que realizan esta transformación. Es también el caso de la celulosa y de los substratos lignocelulosicos en general, los cuales necesitan drásticos tratamientos físicos y/o químicos antes de ser utilizables con este fin. Otros nutrientes que son necesarios en cantidades importantes para el crecimiento microbiano son: nitrógeno, fósforo y azufre.³¹

Estos elementos son incorporados en las moléculas estructurales y funcionales de la célula. El nitrógeno, en particular, debe ser provisto de proporciones variables bajo la forma de nitrógeno proteico obtenido a partir de subproductos de la Industria del maíz, extracto de levadura u otros y no proteico (sales de amonio, urea, etc.). Los otros dos elementos son entregados como sales de fosfato y sulfato, respectivamente. Por último, una serie de micronutrientes (vitaminas, hierro, cobalto, cobre, zinc, etc.), los que deben ser suministrados al medio.³¹

2.6.4. Etapas para la obtención de un producto microbiano, en un fermentador

a) Preparación del inóculo. Viene a ser la propagación de cultivo que se realiza en el laboratorio y que comienza generalmente en un tubo de ensayo que contiene un repique reciente del microorganismo seleccionado. Una forma de realizar este objetivo es reciclar las células microbianas y las enzimas.³¹

b) Preparación del medio de cultivo. Un medio de cultivo debe tener los elementos necesarios como carbono y nitrógeno. Se debe adicionar nutrientes como oligoelementos y vitaminas, luego ajustar el pH, entre otros parámetros para conseguir la producción de metabolitos.³¹

c) Esterilización del medio de cultivo. Para evitar la contaminación del medio por microorganismos indeseables, es necesario esterilizarlo y mantener condiciones asépticas durante la fermentación (aireación estéril, adición de nutrientes estériles, etc.). Esto se debe a que la mayoría de los productos biológicos obtenidos hasta hoy son producidos en cultivo puro, es decir, por un solo microorganismo.³¹

d) Síntesis del producto. En función del producto y del microorganismo empleado se determina la modalidad de funcionamiento del fermentador; continua o discontinua. En los procesos discontinuos o batch, el aporte de nutrientes es único, el tiempo de fermentación es limitado y el producto es recuperado íntegramente al final de la fermentación por vaciado de la cuba del fermentador. Este método actualmente, es el más utilizado para los productos que necesitan condiciones de esterilidad muy estrictas. En los procesos continuos, el aporte de nutrientes es renovado regularmente y el producto es removido al mismo tiempo³¹.

La máxima velocidad de crecimiento de un microorganismo es el resultado de las características inherentes de éste, más que la consecuencia de la disponibilidad de las mejores condiciones, el crecimiento es exponencial. Una disminución en la velocidad de crecimiento puede operarse limitando la disponibilidad de cualquier nutriente esencial. En esta nueva situación el crecimiento se encuentra desequilibrado y los nutrientes divergen hacia otras rutas metabólicas que no son aparentemente indispensables para el crecimiento. El tipo de metabolito secundario que será sintetizado dependerá del microorganismo involucrado y del nutriente limitante en el medio de cultivo (carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, etc.).³¹

e) Separación del medio y del metabolito. El metabolito puede encontrarse dentro de la célula o en el exterior en el medio de cultivo para ello se utilizan una gran diversidad de técnicas para la separación de metabolitos tanto primarios y secundarios como: floculación, filtración, centrifugación y las técnicas de cromatografías, etc.³¹

f) Purificación del metabolismo. Si el producto es extracelular, se encontrará relativamente puro, pero diluido en un gran volumen de agua. Si es intracelular estará mezclado con todos los constituyentes celulares y será necesario que separarlo de ellos. Para obtener un producto intracelular, se debe romper las paredes de los microorganismos, quedando mezclado con todos los constituyentes celulares. Para separarlo se utilizan diversos métodos, tales como: precipitación con sales o alcohol y/o cromatografías, (que separan las moléculas por su tamaño, carga eléctrica o por su afinidad por algún reactivo químico).³¹

2.7. Antagonismo microbiano

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad.³²

2.7.1. Mecanismos de acción

No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferentes modos de acción.³² Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos:

a) Antibiosis

Se refiere a la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). La antibiosis es el mecanismo de antagonismo entre microorganismos más estudiado. Es deseable que la antibiosis no sea el principal mecanismo de acción de un antagonista. Esto se debe a que, al igual que cuando se usan microbiocidas sintéticos, existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico.³³

b) Competencia

Se puede definir competencia como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio, así como también por espacio.³³

c) Interacción directa con el patógeno

c.1) Parasitismo

El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasite a otro. Puede ser definido como una simbiosis antagonista entre organismos.

El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente se ven implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas que rompen las estructuras de los hongos parasitados.³³

c.2) Predación

En el caso de la Predación el antagonista se alimenta de materia orgánica entre la cual ocasionalmente se encuentra el patógeno. No ha sido un mecanismo de acción muy importante en el desarrollo de agentes de biocontrol. Los reportes más conocidos citan la presencia de amebas en suelos supresores de enfermedades las cuales se alimentan de las hifas de hongos patógenos entre otras fuentes de alimento.³³

d) Inducción de resistencia.

Los hongos como otros seres vivos del planeta han pasado por un proceso evolutivo desde su aparición sobre la tierra lo que les llevó a desarrollar mecanismos de defensa muy poderosos contra sus invasores. De esta forma se acostumbra a postular que la resistencia es la regla mientras que la susceptibilidad es la excepción. Al elegir una planta cualquiera y comparamos el inmenso número de microorganismos que existe en su entorno sobre la tierra con el limitado número de microorganismos patógenos de ella debemos concluir que esto es así. Los hongos presentan entonces mecanismos bioquímicos y físicos o estructurales de resistencia. Todos ellos gobernados genéticamente.³⁴

2.8. Otras definiciones

2.8.1. Bacterias patógenas

Casi 200 especies de bacterias son patógenas para el ser humano, es decir, causantes de enfermedades. El efecto patógeno varía mucho en función de las especies y depende tanto de la virulencia de la especie en particular como de las condiciones del organismo huésped.³⁵

Los efectos de los patógenos provocados por las bacterias en los tejidos pueden agruparse en cuatro clases: efectos provocados por la acción directa local de la bacteria sobre los tejidos, efectos de respuesta del organismo ante ciertas infecciones bacterianas en los tejidos como las cavidades formadas en los pulmones en la tuberculosis o la destrucción de tejido en el corazón por los propios anticuerpos del organismo en las fiebres reumáticas y el efectos provocados por toxinas producidas por las bacterias, sustancias químicas que resultan tóxicas.³⁵

2.8.2. Principio activo

Principio activo, es la sustancia importante desde el punto de vista farmacológico y es responsable de la acción farmacológica del hongo y planta. Ejemplo, la morfina y codeína en el opio. La alta calidad de un principio activo droga es de importancia fundamental y se debe tratar de alcanzar y mantener ese nivel de calidad.³⁶

a) Triterpenos y esteroides

Compuestos de C_{30} , procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura siempre policíclica normalmente tetra o pentacíclica, Casi

siempre hidroxilados en el carbono 3 presenta al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte, siendo excepcionales las modificaciones profundas del esqueleto básico. No existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo tres metilos. Se ha demostrado la actividad antiinflamatoria de la fracción triterpenica aislada del *Crataegus monologada*. Cuyo componentes principales el cicloartenol. La fracción triterpenica aislada de *Scoparia dulcis* también presenta actividad analgésica y antiinflamatoria que ha sido demostrado y comparada con el triterpeno glutinol.³⁶

b) Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos, en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos. El término se aplica a estructuras muy diversas como, 2-fenil cromonas, flavonas y flavonoles. Son pigmentos amarillos que se hallan ampliamente distribuidos en los vegetales superiores. Entre los constituyentes mejor conocidos de los flavonoides figuran; rutanina, quercitina y los bioflavonoides cítricos. A la rutina y al hespéridana se las denomina vitamina P o factores de permeabilidad. Desde la antigüedad se utilizaron en el tratamiento de diversos estados que se caracterizan por hemorragias y excesiva fragilidad capilar. Las actividades farmacológicas han sido atribuidas a algunos flavonoides, particularmente relacionados a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas.³⁶

c) Taninos

Son productos naturales de estructura polifenólica, que se caracterizan por curtir la piel, tienen la propiedad de precipitar a los alcaloides, gelatina y otras proteínas en solución y se combinan con ellas, dan coloraciones con las sales férricas, los cuales varían desde azul negrozco, negro, hasta verde. Muchos de los metabolitos obtenidos de plantas medicinales contienen taninos, ratania, gambir y quino, como también los taninos parcialmente purificados (ácido tánico) los cuales se emplean en medicina como astringentes del tracto gastrointestinal y de las excoiaciones de la piel. La acción protectora e inhibidora de las secreciones y exudaciones, la acción antiinflamatoria hace útiles a los taninos en las heridas.³⁶

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización de zona de estudios

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes de los laboratorios de Biotecnología de la Escuela de Formación profesional de Biología y laboratorio de Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Distrito de Ayacucho, Provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a una altitud de 2 760 msnm con una temperatura promedio de 15,5°C y una humedad relativa promedio de 46%, durante los meses de noviembre del 2013 a setiembre del 2014.

3.2. Muestra y sistema de muestreo

- Se realizó el muestreo de dieciséis unidades, cada uno conteniendo 5 a 10 hojas de *Piper elongatum* "matico", tomados de las cuatro zonas de muestreo determinado previamente por el método no probabilístico o por conveniencia.
- Los criterios de inclusión para la toma de muestra fueron, por ser una zona cercana al lugar de la investigación, así como un menor tiempo de traslado para su procesamiento.

3.3. Metodología para la recolección de datos

3.3.1. Muestreo de la planta medicinal

- Se colectaron entre 5-10 hojas de *Piper elongatum* "matico", entre las 8:00-9:00 am con 5 repeticiones, de los jardines de la Escuelas de Formación Profesional de Biología, Medicina Veterinaria, Enfermería y de la Facultad de Derecho, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, entre los meses de Noviembre -Diciembre de 2013 a una altitud de 2 760 msnm.

- Se cortaron las ramas y hojas sanas, aquellas que no presentaron manchas ni daños por insectos u otro factor mecánico, se colocaron en bolsa de polietileno, se codificó y luego se trasladaron al laboratorio de Biotecnología microbiana.⁸

3.3.2. Limpieza y desinfección

- Se lavaron las hojas con agua corriente para retirar los residuos externos.
- Las hojas fueron sumergidas en etanol al 70% por un minuto, hipoclorito de sodio 3,5% por tres minutos, en etanol al 70% por 30 segundos, luego los fragmentos se enjuagaron con agua destilada estéril entre 5 a 6 veces.⁸

3.3.3. Control de esterilidad

- El agua del último enjuague, fue sembrado por agotamiento en superficie usando un asa de Kolle sobre agar nutritivo y medio TSA. Luego se incubó en una estufa a 25°C por 48 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se verificó la ausencia de crecimiento, ésto demostró una buena desinfección, garantizando que los microorganismos que se desarrollaron de los fragmentos de la planta sean endofíticos.³⁷

3.3.4. Aislamiento de hongos endofíticos

- Se cortaron las hojas de *Piper elongatum* "matico" en trozos de 0,5x0,5 cm. Se trabajó considerando condiciones de esterilidad para lo cual se usaron; hojas de bisturís asépticas, placas Petri estériles. Así como la cámara de flujo laminar y mecheros de alcohol.
- Se colocaron 8 trozos de hojas sobre placas Petri estériles conteniendo medios de cultivos; agar Sabouraud y agar papa dextrosa. Se incubaron en estufas a temperatura de 25°C por 7 a 15 días.
- Al formarse las colonias, éstas fueron transplantadas a viales conteniendo agar Sabouraud, se incubó a 25°C, se guardó como cepario para su identificación y producción de sus metabolitos secundarios.¹⁶

3.3.5. Caracterización e identificación de hongos endofíticos

a) Características macroscópicas

- Las colonias formadas sobre agar Sabouraud fueron observadas a los 7 días de crecimiento. Se describieron sus características.

b) Características microscópicas

b.1. Técnica de microcultivo

- Usando un bisturí estéril, se cortó un pequeño cubo de agar Sabouraud, se colocó sobre una lámina portaobjeto estéril.
- Se sembró por picadura superficial la colonia seleccionada, se cubrió con una laminilla cubreobjetos estéril.
- Se colocó la lámina con cultivo en una placa de Petri conteniendo la varilla de vidrio en "V" o "U" y se adicionó agua destilada estéril con la finalidad de mantener la humedad y se incubó a 25 por 5 a 7 días.
- Se separó la laminilla de la lámina, se colocó en forma invertida sobre una lámina portaobjetos nueva y se dejó secar por 15 minutos.
- Las estructuras se fijaron usando metanol y luego se colorearon con lactofenol azul de tripán.
- Se observó al microscopio para su identificación, se usó claves taxonómicas.³⁸

3.3.6. Cultivo de hongos y mantenimiento de cepas

- Las cepas se mantuvieron a corto y mediano plazo mediante resiembras en placas de Petri con agar papa dextrosa (APD), incubadas a temperatura ambiente durante 7 a 10 días (hasta observar desarrollo de la colonia) luego transplantados en viales con APD y conservadas a 4°C.³⁹

3.3.7 Producción de metabolitos por fermentación

a. Esporulación de los hongos

- Los hongos endofíticos fueron sembrados en una placa conteniendo APD incubados a 25°C por 7-15 días hasta observar completa esporulación.⁴⁰

b. Inóculo

- Se cosechó los conidios, en 5 ml de solución salina fisiológica (SSF), hasta tener una densidad comparable con el tubo N°5 de la escala de Mc Farland, lo que equivale aproximadamente a una concentración de 1×10^7 conidios/ml.

- Luego se inoculó 1 ml de la suspensión de esporas en frascos conteniendo 9 ml de medio caldo papa sulfato de amonio, se incubó a 25°C en agitación constante de 120 rpm; por 3 días.⁴⁰

d. Proceso fermentativo

- La fermentación se llevó cabo en frascos de 500 ml, conteniendo 90 ml de caldo papa dextrosa sulfato de amonio a los que se inoculó 10 ml de hifas formadas en el proceso anterior.
- Los frascos inoculados se incubaron a 25°C por 15 días (264 horas) en agitador horizontal.
- El medio de cultivo caldo papa sulfato de amonio conteniendo la biomasa y los metabolitos, fueron filtrado utilizando papel filtro con la finalidad de separar la biomasa, del extracto de caldo crudo.⁴⁰

3.3.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana

a. Actividad antibacteriana

- Se realizaron, pruebas de sensibilidad; por difusión en agar, donde fueron evaluadas las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC-6803, *Escherichia coli* INS 4672.
- Se sumergió un hisopo estéril en suspensión de las células bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC-6803, *Escherichia coli* INS-4672 de 18 horas de crecimiento en caldo nutritivo (pH 6.5+/-0.2 a 37°C) en un tubo conteniendo 5ml de SSF estéril comparando la turbidez con el tubo N°5 de la escala de Mac Farland, que equivale a una concentración aproximada de 10^8 UFC/ml.⁴¹
- Se cultivó en la superficie seca de la placa de agar Muller Hinton, según la metodología y criterios de la OPS, usando el hisopo para cubrir toda la placa de forma uniforme. Por duplicado⁴¹
- Antes de colocar los discos de papel se embebieron con los metabolitos producidos y se dejó secar a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para evaporar el exceso de humedad.⁴¹
- Los discos de papel conteniendo los metabolitos fúngicos y controles positivos (cefalexina para *Staphylococcus aureus*; norfloxacino para *Escherichia coli*), se colocaron sobre la superficie del agar Muller Hinton con

la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco de papel para asegurar el contacto completo con la superficie del medio.⁴¹

- Se incubaron las placas en posición invertida a 37°C por 24 a 48 horas.
- Se midieron los halos de inhibición formados.⁴²

3.3.9. Estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios

a. Extracción y aislamiento de metabolitos

- El extracto de caldo crudo fue sometido a un sistema de extracción líquido-líquido, con acetato de etilo (AcOEt) y luego fue concentrado en un rota vapor; obteniendo extracto de caldo.⁴³
- Se realizaron cromatografías de capa delgada con silica gel 60G, en vidrio y aluminio para observar la separación de metabolitos secundarios, usando como fase móvil dos sistemas de solventes como cloroformo-metanol 9,0:1,0 y butanol-agua-ácido acético glacial (4:1:5) y se observaron las manchas fluorescentes utilizando una Lámpara de luz ultravioleta CAMAG (366 – 254 nm) y reveladas con vainillina- sulfúrico.⁴³
- Los componentes separados por cromatografía fueron leídos por espectrofotometría a una longitud de onda de 200-500nm para su identificación.⁴³

b. Tamizaje (screenig) químico de los extractos líquido de caldo

- La caracterización química se basó en el agrupamiento de metabolitos estructuralmente semejantes, para identificarlos por su comportamiento químico frente a reacciones estandarizadas. Se realizaron las pruebas de coloración y precipitación.⁴⁴

3.4. Análisis de datos

Con los datos obtenidos en los procedimientos antes mencionados, se realizaron un análisis estadístico del tipo descriptivo, para luego presentar en forma de tablas.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Hongos endofíticos aislados de las hojas de *Piper elongatum* "matico" en las cuatro zonas de muestreo. Ayacucho, 2013.

N° MUESTREO	MEDIO	CÓDIGO	N° DE COLONIAS	GÉNERO
1	APD	V1GA6	6	<i>Alternaria</i>
	APD	V1GP3	3	<i>Penicillium</i>
	AS	V1CP1	1	<i>Penicillium</i>
	AS	V1CA3	3	<i>Alternaria</i>
2	APD	B2LA5	5	<i>Alternaria</i>
	APD	B2LX1	1	<i>Aspergillus</i>
	APD	B2LP4	4	<i>Penicillium</i>
	AS	B2SA4	4	<i>Alternaria</i>
	AS	B2SP3	3	<i>Penicillium</i>
3	APD	D3APA5	5	<i>Alternaria</i>
	APD	D3DPA5	5	<i>Alternaria</i>
	APD	D3PDP2	2	<i>Penicillium</i>
	AS	D3SP2	2	<i>Penicillium</i>
	AS	D3SA3	3	<i>Alternaria</i>
4	APD	E4APA4	4	<i>Alternaria</i>
	APD	E4GPA4	4	<i>Alternaria</i>
	APD	E4APP3	3	<i>Penicillium</i>
	APD	E4PAP2	2	<i>Penicillium</i>
	AS	E4SA5	5	<i>Alternaria</i>
	AS	E4SP2	2	<i>Penicillium</i>
	AS	E4SX2	2	<i>Aspergillus</i>

Tabla 2. Frecuencia de géneros de hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho, 2013.

CEPA	N°	FRECUENCIA (%)
<i>Alternaria</i>	44	63,77 %
<i>Penicillium</i>	22	31,88 %
<i>Aspergillus</i>	3	4,35 %
TOTAL	69	100

Tabla 3 Actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios de hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico" frente a la cepa de *Escherichia coli* INS-4672 y a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC-6803. Ayacucho, 2013.

GÉNERO	CÓDIGO	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA			
		<i>E. coli</i>	norfloxacino	<i>S. aureus</i>	cefalexina
<i>Penicillium</i>	V1GP3	23	32	-	18
<i>Alternaria</i>	B2LA5	27	40	-	-
<i>Penicillium</i>	B2LP4	21	35	-	14
<i>Alternaria</i>	D3APA5	29	37	-	-
<i>Penicillium</i>	D3PDP2	48	50	16	38
<i>Penicillium</i>	E4APP3	33	40	-	-
<i>Alternaria</i>	E4SA5	42	48	9	42
<i>Aspergillus</i>	E4SX2	35	42	11	32

Tabla 4. Compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina de los extractos de caldo líquido producidos por tres cepas de hongos endofíticos aislados a partir de las hojas de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho, 2013.

NÚMERO DE COMPUESTOS QUÍMICOS				
SISTEMA DE SOLVENTES	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Aspergillus</i>	TOTAL
	E4APP3	E4SA5	E4SX2	
CHCl ₃ : CH ₃ OH (9:1)	5	3	2	10
BAW (4:1:5)	8	6	4	18

Tabla 5. Metabolitos secundarios analizados del extracto de caldo producidos por el hongo endofíticos del género E4APP3 (*Penicillium*) aislado de *Piper elongatum* "matico. Ayacucho. 2013.

METABOLITO SECUNDARIO	ENSAYOS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Alcaloides	Dragendort	-	no hay cambio
Alcaloides	Mayer	-	no hay cambio
Compuestos grasos	Sudan	-	no hay cambio
Lactonas y camarinas	Baljet	-	no hay cambio
Triterpenos y esteroides	Liberman Burchard	+	verde tenue
Flavonoides	Shinoda	-	no hay cambio
Glicósidos cardiotónicos	Kedde	+	violeta claro
Azúcares reductores	Fehling	+	rojo claro
Saponinas	Espuma	-	no hay cambio
fenoles	Cloruro férrico	-	No hay cambio

V. DISCUSIÓN

En las tablas 1 y 2, observamos los hongos endofíticos aislados a partir de las hojas de *Piper elongatum* "matico" identificado por sus características macroscópicas y microscópicas predominando el género *Alternaria* con 63,77% y el género *Penicillium* con 31,88% y en menor porcentaje el género *Aspergillus* con 4,35%.

La proporción reportada de los géneros aislados e identificados se puede atribuirse a la predisposición que tienen estos hongos por la planta y las condiciones ambientales, el tipo de suelo, pH en que se encuentren.

Las bacterias, hongos y actinomicetos están indisolublemente asociados a las plantas como patogénicas, epifitas, endófitas, simbióticas y antagónicas. Muchas veces forman asociaciones íntimas con las plantas así como también forman grupos filogenéticamente representados por especies pertenecientes a los principales taxones. Las bacterias, hongos y actinomicetos asociados a las plantas intercambian señales con su hospedero y poseen diversos mecanismos para su adaptación y colonización. Los aspectos importantes de la diversidad de bacterias, hongos y actinomicetos en el ecosistema incluyen en los diferentes procesos que éstos realizan, la complejidad de la interacción y el número de niveles tróficos que lo componen.¹¹

Los hongos son microorganismos con gran capacidad de influir el destino y la disponibilidad de los nutrientes en un ecosistema, por lo que es viable pensar que su presencia tenga repercusiones fisiológicas en el hospedero. Por ejemplo las especies de endofíticos puede afectar diferencialmente la tasa de uso de fotosintatos, ya que las especies varían en su requerimiento y preferencias nutritivas.⁴⁵

Podemos afirmar también que cepas fúngicas endofíticos como el *Aspergillus*, *Alternaria* y *Penicillium* fueron encontrados y reportados por otros investigadores

al realizar sus estudios en una gran diversidad de plantas medicinales observándose la existencia de éstos y otros géneros de hongos como:

Cisneros,⁴⁶ en su trabajo de investigación sobre el aislamiento e identificación de hongos y actinomicetos endofíticos aislados a partir de *Piper elongatum* "matico", realizado en Ayacucho, logró obtener 56 cepas fúngicas en las que los géneros más frecuentes fueron; *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus*, (67,86%, 28,57% y 3,57%).

Ramírez *et al*,⁸ en su investigación referida a la actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas, logró aislar hongos endofíticos asociados a *Baccharis latifolia*, *Baccharis obtusifolia* *Piper barbatum*, *Borreira laevis*. Identificando a los hongos; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Nigrospora*.

Chapaval,¹¹ trabajó en Floresta en el aislamiento de hongos endofíticos a partir de hojas de la hierba-mate *Ilex paraguariensis* nativas y cultivadas, obteniendo resultados de la existencia de una gran diversidad de hongos endofíticos en mayor proporción en hojas nativas que en las cultivadas, entre los hongos endofíticos aislados destacan; el *Acremonium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Dendrophoma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *verticillum* y 13 cepas aún no identificadas.

Rivera *et al*,⁴⁷ publicaron su trabajo de investigación del aislamiento e identificación de hongos endofíticos productores de taxol a partir de muestras mexicanas y europeas en la que lograron la obtención de 30 cepas diferentes de hongos; 22 de las muestras de *Taxus globosa* y 8 de *Taxus baccata*.

Makowiecky,⁹ en el Brasil investigó la comunidad de hongos endofíticos como *Cladosporium*, *Eppicocum*, *fusarium*, *Guignaria*, *Pestalotiopsis* y *Xylaria*; asociada a la caña de azúcar convencional y genéticamente modificada.

Sayuri,¹⁰ en la Universidad de Sao Paulo (Brasil) trabajó la diversidad y el potencial biotecnológico de los hongos endofíticos del cacao *Theobroma cacao* L. como controlador biológico de *Crinipellis perniciososa*, aislando cepas fúngicas como *Fusarium*, *Gibberella*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Verticillum*.

En tabla 3 se observa la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios, producidos mediante fermentación de ocho hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico" frente a cepas de bacterias patógenas, *Escherichia coli* INS-4672 y *Staphylococcus aureus* ATCC-6803, de los metabolitos secundarios

producidos, las que tuvieron mayor actividad fueron los metabolitos producidos por las cepas de los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus* E4PP3, E4SA5 y E4SX2, con diámetros de halos de inhibición de 48 mm, 42 mm y 35 mm respectivamente que mostraron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* INS- 4672.

Y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC-6803, las que tuvieron actividad antibacteriana fueron las cepas de los géneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, identificadas como con códigos E4PP3, E4SA5 y E4SX2, con diámetros de halos de inhibición de 16 mm, 9 mm y 11 mm respectivamente

Se puede atribuir esta capacidad antibacteriana de los metabolitos secundarios por las tres cepas los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Aspergillus* E4PP3, E4SA5 y E4SX2, debido a que estas fueron las que mayor cantidad de conidios formaron, al momento de realizar las fermentaciones, así como poseen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

Se ha descrito en la literatura que los metabolitos secundarios fúngicos tienen una acción protectora contra los insectos herbívoros en gramíneas y coníferas y un buen número de ellos son potenciales antimicrobianos. Resulta de interés considerar que dentro de los beneficios medicinales de algunos de las cuatro muestras analizadas, se mezcla su acción analgésica, antiinflamatoria y antimicrobiana, se espera que los endófitos fúngicos puedan contribuir en sus efectos benéficos en la farmacopea popular.⁸

Chaparro,⁴⁹ en su trabajo de investigación titulado aislamiento e identificación de metabolitos secundarios producidos por una cepa nativa SPG 321 y posteriormente la evaluación de su capacidad antimicrobiana, realizó las pruebas antimicrobianas a partir del extracto total de caldo y micelios frente a bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, llegando a la conclusión que, la fracción CHCl_3 en biomasa mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y resistente para *Escherichia coli* ATCC 25922.

Torrenegra,⁴³ en su trabajo de investigación sobre la Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium sp.* 28 aislada del páramo de Guasca, reportó que los antibiogramas realizados a las bacterias Gram positivas permitieron concluir, que el metabolito secundario J1, con una concentración de 200 µg/ml, presenta sensibilidad frente *Bacillus subtilis* con un

halo de 20 mm y contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* con un halo de inhibición de 18 mm.

De igual manera podemos decir que un estudio similar realizado por Cisneros⁴⁸ sobre el aislamiento e identificación de hongos endofíticos aislados de hojas y tallos a partir de *Piper elongatum* "matico", con capacidad antimicrobiana de cuatro cepas de bacterias patógenas expuso sus resultados y formó un halo con mayor diámetro el género *Penicillium* (4AT2b), *Alternaria* (1PH1) mostró una capacidad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538, de la misma forma para la cepa de *Aspergillus* (2PT1) que presenta como capacidad inhibitoria frente a *Salmonella paratyphi* MOR.

Según Ramírez,⁸ en su trabajo de investigación titulado actividad antagónica de hongos endofíticos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas realizado en la Universidad Particular de Loja – Ecuador público a cerca de la evaluación de la interacción antagónica entre los aislados fúngicos y bacterias patógenas las cepas con las que se evaluó la interacción fueron *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *Klebsiella pneumoniae* sub sp, *pneumoniae*, ATCC-9997, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *Escherichia coli* ATCC- 25922. Encontrando que existe la interacción antagónica de algunas de las cepas de hongos aislados que mostraron actividad frente a las bacterias; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* sp, *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, donde la mayor actividad se detectó con *Mycelia sterilia* frente a *klebsiella Pneumoniae*.

En la Tabla 4 se muestra el número de compuestos obtenidos por cromatografía de capa fina (silica gel 60G) en soporte de aluminio usando dos tipos de sistemas de solventes (fase móvil), a partir de los extractos de caldo de cultivo producidos por fermentación de las tres cepas de hongos endofíticos con mayor actividad antimicrobiana aisladas de *Piper elongatum* "matico", las que fueron extraídas por una fracción de acetato de etilo (v/v), se lograron separar; para el primer extracto de la cepa del género *Penicillium* cinco compuestos, para el segundo extracto del género *Alternaria* tres compuestos y para el tercer extracto del género *Aspergillus* sólo dos compuestos. Mientras que al utilizar como fase móvil al sistema butanol ácido acético glacial y agua se pudieron separar, para el primer extracto del género *Penicillium* ocho compuestos, para el segundo extracto del género *Alternaria* seis compuestos y para el tercer extracto del género *Aspergillus* sólo cuatro compuestos. Los compuestos fueron separados y

leídos en espectrofotómetro a una longitud de onda de 200-500 nm para su identificación, se observó que existe diferencia entre los compuestos pues cada uno de ellos presenta diferente curva de absorción.

Cabe resaltar que también se hizo un revelado con vainillina ácido sulfúrico sobre los compuestos separados con el solvente cloroformo metanol encontrándose en estas coloraciones características de posibles terpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides porque son recurrentes en los hongos filamentosos, que pueden ser observados en el anexo.^{13,15}

Los resultados obtenidos se puede atribuir a que este es un estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios de hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico", es decir que se realizaron ensayos básicos para determinar a los metabolitos presentes, así también como existen una asociación simbiótica con la planta que se confieren beneficios mutuos.

Gutiérrez,⁴⁹ en la investigación realizada sobre metabolitos secundarios producidos por hongos fitopatógenos con capacidad antimicrobiana, reporta que los cultivos se extrajeron con acetato de etilo. De estos microorganismos logró aislar 14 metabolitos secundarios los cuales fueron, Caracterizados por métodos espectroscópicos, logrando aislar y reportar los siguientes compuestos coletorina B, coletoclorina B, ilicicolina C, ilicicolina E, ilicicolina F y α,β -dehidrocurvularina. Así como; sesquiterpeno ácido condrosterpurico, que corresponde a un nuevo esqueleto químico, los sesquiterpenos sterepolido, dehidrosterepolido, 8-hidroxiidihidrosterepolido (descrito por primera vez), entre otras.

Chaparro,⁵¹ en su trabajo de investigación sobre aislamiento e identificación de metabolitos secundarios producidos por una cepa nativa SPG 321, mediante la técnica de gases acoplados a masas CG-EM, concluye que las cepas producen ácidos grasos insaturados. A partir del micelio se obtuvo un esteroles, que corresponde a un ergosterol compuesto denominado M.cB3. se presentaron dos ácidos grasos insaturados en dos mezclas M.cB1 y M.cB2.

Nieto,⁵⁰ en la investigación sobre ácidos grasos, ésteres y esteroides del cuerpo fructífero del hongo *Laccaria laccata*, obtuvo extracto utilizando acetato de etilo, luego identificó 3 ácidos grasos, 6 ésteres etílicos, 5 esteroides y un triterpeno ergostánico.

Torrenegra,⁴⁵ en su trabajo de investigación sobre la Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium spg 28*. aislada del páramo de guasca. Reportó que la cepa de *Penicillium verrucosum*

sp. 28, produjo metabolitos secundarios a partir de un medio de cultivo líquido papa glucosa sulfato de amonio, y el medio químicamente definido de biotransformación alfa; obtuvo la sustancia J1, y determinó que corresponde a un metabolito de tipo lactona y ácido 6- (4- hidroxí-6-metoxí7-metil-3-oxo-ftalan-5-il)-4-metil-hexen-4-oico.

En la tabla 5 se muestra el tamizaje químico, con la finalidad de identificar metabolitos secundarios realizado a partir del extracto de caldo de cultivo producido por la cepa del género *Penicillium* E4PP3, se identificó; azúcares reductores, triterpenos esteroides, glicósidos cardiotónicos.

De los resultados obtenidos podemos decir que los ensayos realizados a los extractos de caldo para identificar a los metabolitos secundarios, se puede decir que están estandarizados para plantas mas no para hongos es por ello que no se pudo identificar. Así como también no se encontraron trabajos que se aplicaran estos ensayos para determinar a los metabolitos secundarios producidos por los hongos.

VI. CONCLUSIONES

1. Del análisis químico preliminar de los metabolitos secundarios producidos por fermentación de tres hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico" con actividad antibacteriana, se encontró ocho compuestos a partir de *Penicillium* (E4APP3), seis compuestos de *Alternaria* (E4SA5) y cuatro compuestos de *Aspergillus* (E4SX2), identificando estos metabolitos secundarios como: terpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides, compuestos saturados, azúcares reductores glicósidos cardiotónicos, terpenos esteroideos.
2. Las 69 cepas de hongos endofíticos identificadas de *Piper elongatum* "matico", correspondieron a: 44 cepas de *Alternaria* (63,77%), 22 cepas de *Penicillium* (31,88%) y 3 cepas de *Aspergillus* (4,35%).
3. Los metabolitos secundarios producidos por fermentación a partir de las cepas de "matico"; el género *Penicillium* (E4APP3), *Alternaria* (E4SA5) y *Aspergillus* (E4SX2), tuvieron actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* INS- 4672 y *Staphylococcus aureus* ATCC-6803

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** En posteriores investigaciones se debe tener en cuenta la optimización de parámetros como concentración de inóculos evaluación de los nutrientes y sustratos, pH y temperatura con la finalidad de incrementar la producción de metabolitos.
- 2.** Realizar las pruebas de antibiosis usando un número mayor de cepas de bacterias patógenas.
- 3.** Probar una mayor cantidad de solventes para la extracción y separación de metabolitos secundarios.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 491–502 Vol. 67. 2003 [Revista en internet] 2004 diciembre [acceso 21 de enero 2014]67(4):491–502. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309047/>
2. Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M, Puglia AM. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*. 2002 [Artículo en internet] 2003 marzo. [acceso 9 diciembre 2013] 99, 187-198. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165602002092>
3. Camporese A, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, De Simona F, and Tubazo A. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *J. Ethnopharmacol.* 2003 [Artículo en internet] 2003. Julio [acceso diciembre 2013] 87, 103-107. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103001156>
4. Bacon CW, Porter JK, Corred WP, Leslie JF, Production of Fusaric Acid by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006 [Artículo en internet] 2006. noviembre [acceso 18 octubre 2013] 62, 4039-4043. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168225/>
5. Pocasangre E, Felde A, Cañizares. Manejo alternativo de fitonematodos en bananos. In *Memorias. XVI reunión internacional de ACORBAT, Aoxaca*. 2004 [Revista en internet] 2004. mayo [acceso 21 febrero 2013]. MX. P. 106-112. Disponible en:
http://www.musalit.org/viewPdf.php?file=IN050664_spa.pdf&id=9605
6. Barrios M. Estudio de Hongos Endofíticos como inductor de Resistencia para el control de *Sigotoka Negra (Micosphaerella fijiensis)* en platano. Universidad de Tolima. Costa Rica. 2006 [Revista en internet] 2006. abril [acceso 26 octubre 2013] 62, 4043-4065. Disponible en:
<http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0991E/A0991E.PDF>
7. Chavez P. Utilización de hongos y bacterias endofíticos para el control biológico del nematodo barredor *Rodophulos Similis*. Universidad de Tolima. Costa Rica. 2007 [Revista en internet] 2007. diciembre [acceso 26 octubre 2013] 62, 4043-4065. Disponible en:

- http://www.musalit.org/viewPdf.php?file=IN060632_spa.pdf&id=14443
8. Ramirez J, Delgado E, Rodolfi M, Solveig T. Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. 2006 [Revista en internet] 2007. Marzo [acceso 12 octubre 2013]. Vol. 21: 49 - 53 Disponible en:
<http://es.slideshare.net/fpgordillo/hongos-endfitos-en-plantas-medicinalesRamirez>
 9. Makowiecky R. Comunidades de hongos endofíticos asociada a caña de azúcar convencional e genéticamente modificada. Universidad de Sao Paulo. Brasil. 2006 [Revista en internet] 2007. noviembre [acceso 12 octubre 2013]. Vol. 68: 49 - 53 Disponible en: <http://> [Revista en internet] 2007. Marzo [acceso 12 octubre 2013]. Vol. 21: 49 - 53 Disponible en: <http://es.slideshare.net/fpgordillo/hongos-endfitos.pdf>
 10. Sayuri C. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau *Theobroma cacao*. Universidad de Sao Paulo. Brasil. 2006
 11. Chapaval I. Fungos endofíticos en filholas de Erva *mate Ilex paraguarensis*. Eng.Agronoma. Floresta. Curitiba. Brasil. 2006
 12. Castillo U, Strobel GA, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Munumbicins. Wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology* 2002 [Revista en internet] 2003. abril [acceso 26 octubre 2013]. 148, 2675-2685. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309047/>
 13. Arnold E, Mejia L, Kyllö D, Rojas E, Maynard Z, Robbins N, Allen A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *A. Journal List: ProcNatlAcadSci U S A*. 2003 [Revista en internet] 2003. octubre [acceso 26 agosto 2013]. v.100 en: v.100 (26).antifungicos. *IberoamMicol* 18, 2-5. Disponible: <http://www.pnas.org/content/100/26/15649.short>
 14. Schwarz M, Kopcke B, Weber R, Sterner O, Anke H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry*. 2004 [Revista en internet] 2005. 3 enero [acceso 26 octubre 2013]. 65, 2239–2245. Disponible:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204002973>
 15. Sohrab H. Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from Endophytic Fungi and the Plant *Prisma tomeristetrandra* and

- Synthesis of (+)-Ochromycinone. 2005 [Revista en internet] 2006. 15 junio [acceso 11 diciembre 2013]. 56, 2032–2041. Disponible:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S31942203452549>
16. Salgado C, Cerero MC. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. 2005 [Revista en internet] 2005. 22 setiembre [acceso 15 de diciembre 2013]. 22, 99-101. Disponible:
<http://www.reviberoammicol.com/2005-22/099101.pdf>
 17. Trigos A, Mendoza G, Luna M, Heredia G, Arias R. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. 2005 [Revista en internet] 2005. 13 de marzo [acceso 26 de octubre 2013]. 20, 113-135. Disponible:
<http://www.reviberoammicol.com/2005-20/32785567.pdf>
 18. Zevallos S. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antiinflamatoria de *Piper elongatum* L “matico”. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho. 2008
 19. Aldave A, Mostacero L. Botánica Farmacéutica. Trujillo, Perú: Studium. 1998
 20. Gabieses F. Apuntes de Medicina Tradicional. Lima-Perú CONCYTEC. 2000
 21. Brock T, Madigan M. Microbiología. Sexta ed, Editorial Prentice Hall, México. 2003.
 22. Carrillo A, Brio S, Quindos G. Una nueva generación de fármacos fúngicos. *Iberoam Micol* 18, 2-5. 2001
 23. Picco A, Rodolfi M. Endophytism in grasses with reference to an experience in northern Italy. In “Endophytism in forest tree”. A. Ragazzi, S. Moricca, I. Dellavalle (eds.) Accademia Italiana di Scienze Forestali, Firenze, Italy: 2004 [Revista en internet] 2005. 24 marzo [acceso 15 de diciembre 2013]. 28, 205-219. Disponible:
www.musalit.org/viewPdf.phpfile=IN060632_spa.pdf&id=14443
 24. Tan RX, Zou WX, Endophytes. A rich source of functional metabolites. The Royal Society of Chemistry. 2001 [Revista en internet] 2002. 26 marzo [acceso 15 de diciembre 2013]. 18, 448-459. Disponible:
<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2001/NP/b100918o#ldivAbstract>

25. Ezra D, Hess WM. New endophytic isolates of *Muscodora* bus, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. 2004. [Revista en internet] 2005. 16 de setiembre [acceso 18 de diciembre 2013]. 147,2943-1950. Disponible: <http://mic.sgmjournals.org/content/150/12/4023.short>
26. Lorenzi E, Lorando E, Picco AM. Microfunghi endofitici edepifitici di *Picea abies* (L.) Karst. In ambiente naturale ed antropizzato in Lombardia. *Forest*. 2006 [Revista en internet] 2007. 30 junio [acceso 18 de diciembre 2013]. 3, 426-436. Disponible: <http://www.sciencedirect.com/science/revie/pii/S31942203452549>
27. Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalotaxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2001 [Revista en internet] 2002. 21 diciembre [acceso 19 de diciembre 2013]. 31, 163-167. Disponible: <http://rac1.mardi.gov.my/jtafs/36-1/Endophytic%20fungi.pdf>
28. Radu S, Yoke C. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2002 [Revista en internet] 2003. 9 julio [acceso 19 de diciembre 2013]. Vol. 9, No.2, (23-33). Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/revista/PMC3406204/>
29. Gao X, Zhou H, Xu D, Yu C, Chen Y, Qu L. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters* 249 (2005) 255-266. 2005 [Revista en internet] 2006. 3 febrero [acceso 21 de diciembre 2013]. 249, 255-266. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/revista/PMC3406255/>
30. Flechter A. Physical and chemical Parameters of Microbial Growth. *Advances in Biochemical Engineering* Vol. 30, 7-60. Springer- Verlag. 1984.
31. Monckeberg F. "La Revolución de la Bioingeniería", Edit. Mediterráneo 1988
32. Fernández O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 62 p. 96-100. 2001
33. Méndez S, Mondino P. Control biológico pos cosecha en Uruguay. *Horticultura Internacional*. Noviembre de 1999, Año 7, n° 26. 1999

34. Vicente MF, Cabello A, Platas G, Basilio A, Diez MT, Dreikorn S, Giacobbe RA, Onishi JC, Meinz M, Kurtz MB, Rosenbach M, Thompson J, Abruzzo G, Flattery A, Kong L, Tsipouras A, Wilson KE, Pelaez F. Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of Applied Microbiology* 96, 806. 2001
35. Kurivilla J, Kamath P, Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J of Endod* 7,472-475. 2004
36. Goodman A, Rall, T, Nies A, Taylor, P. *Las Bases Farmacológica de la Terapéutica*. Buenos Aires: Panamericana. 1999
37. S.E.I.M.C. *Procedimientos en microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*. 2010.
38. Araujo W, Sousa A, Acevedo J. *Manual de aislamiento de Microorganismos endófitos*. Universidad de Sao Paulo. 1ra. Edición. Brasil 2002.
39. Daza P. Capacidad biotransformadora y actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios de *Aspergillus niger* 511. Bogotá 2001, 64 p. trabajo de grado (Maestría en Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 2001. [Revista en internet] 2002. 15 diciembre [acceso 21 de diciembre 2013]. 46, 255–266. Disponible: <http://www.javeriana.edu.co/gifuj/biotransformaci%F3n%20por%20A.pdf>
40. Medina A. Evaluación de la capacidad biotransformadora de la cepa nativa *Fusarium Oxysporum* sobre el beta -D- glucopiranosil- éster del ácido 17 (beta glucopiranosiloxil)-16-ol- kauran 19 -oico e identificación de metabolitos secundarios. 66 p. trabajo de grado (Maestría en Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 2001.
41. Sacaquispe E. y Velázquez J. *Manual de procedimientos para sensibilidad de antimicrobiana por el método de difusión*. Instituto nacional de salud. 2002.
42. NCCLS National Comité for Clinical laboratory standard. *Performance Standars for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Document M2-A8. National Comite for Clinical laboratory Standard Vol*

- 23(1). Wayne. Pennsylvania. 2006. Disponible: <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf>
43. Torrenegra R. Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium spg 28*. aislada del Páramo de guasca, departamento de Cundinamarca. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas Departamento de Química. 2004 [Revista en internet] 2005. 23 noviembre [acceso 21 de diciembre 2013]. 84, 576–598. Disponible:
<http://www.javeriana.edu.co/gifuj/biotransformaci%F3n%20por%20A.pdf>
44. Miranda M, Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana Cuba. 2002.
45. Gamboa G. Hongos endofíticos tropicales: Conocimientos actuales y perspectivas; Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Colombia. 2008 [Revista en internet] 2008. 7 noviembre [acceso 23 junio 2014]. 65, 231–248. Disponible:
https://www.google.com.pe/search?q=hongos+endofiticos+tropicales&rlz=1C1SAVM_enPE530PE530&oq=hongos+endofiticos+tropicales&aqs=chrome..69i57j0.14434j0j8&sourceid=chrome&es_sm=93&ie=UTF-8
46. Cisneros J. Aislamiento e identificación de hongos y actinomicetos endofíticos aislados de las hojas y tallos de *Piper elongatum* L “matico” con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho. 2011.
47. Rivera P y González A. Aislamiento e identificación de hongos endofíticos productores de taxol a partir de muestras mexicanas y Europeas. México. 2006 [Revista en internet] 2007. 15 enero [acceso 21 de agosto 2014]. 22, 99–101. Disponible:
https://www.google.com.pe/?gfe_rd=cr&ei=S1AbVInoFZHDqAWH5oDABw#q=aislamiento+e+identificacion+de+hongos+endofiticos+productores+de+taxol
48. Chaparro A. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios producidos por la cepa nativa SPG321 de *mucor circillinoides* y evaluacion de su actividad antibacteriana. departamento de Cundinamarca. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Básicas Departamento de Química. 2010. [Revista en internet] 2010. 23 octubre [acceso 23 junio 2014]. 65, 231–248. Disponible:

https://www.google.com.pe/?gfe_rd=cr&ei=S1AbVInoFZHDqAWH5oDABw#q=aislamiento+e+identificacion+de+metabolitos+secundarios

49. Gutiérrez M. metabolitos secundarios de los hongos fitopatógenos *chondrostereum purpureum* y *nectria galligena* con actividad antimicrobiana y herbicida. Investigación y desarrollo de productos naturales. Chile. 2012 [Revista en internet] 2012. 23 octubre [acceso 23 junio 2014]. 32, 126–147. Disponible:

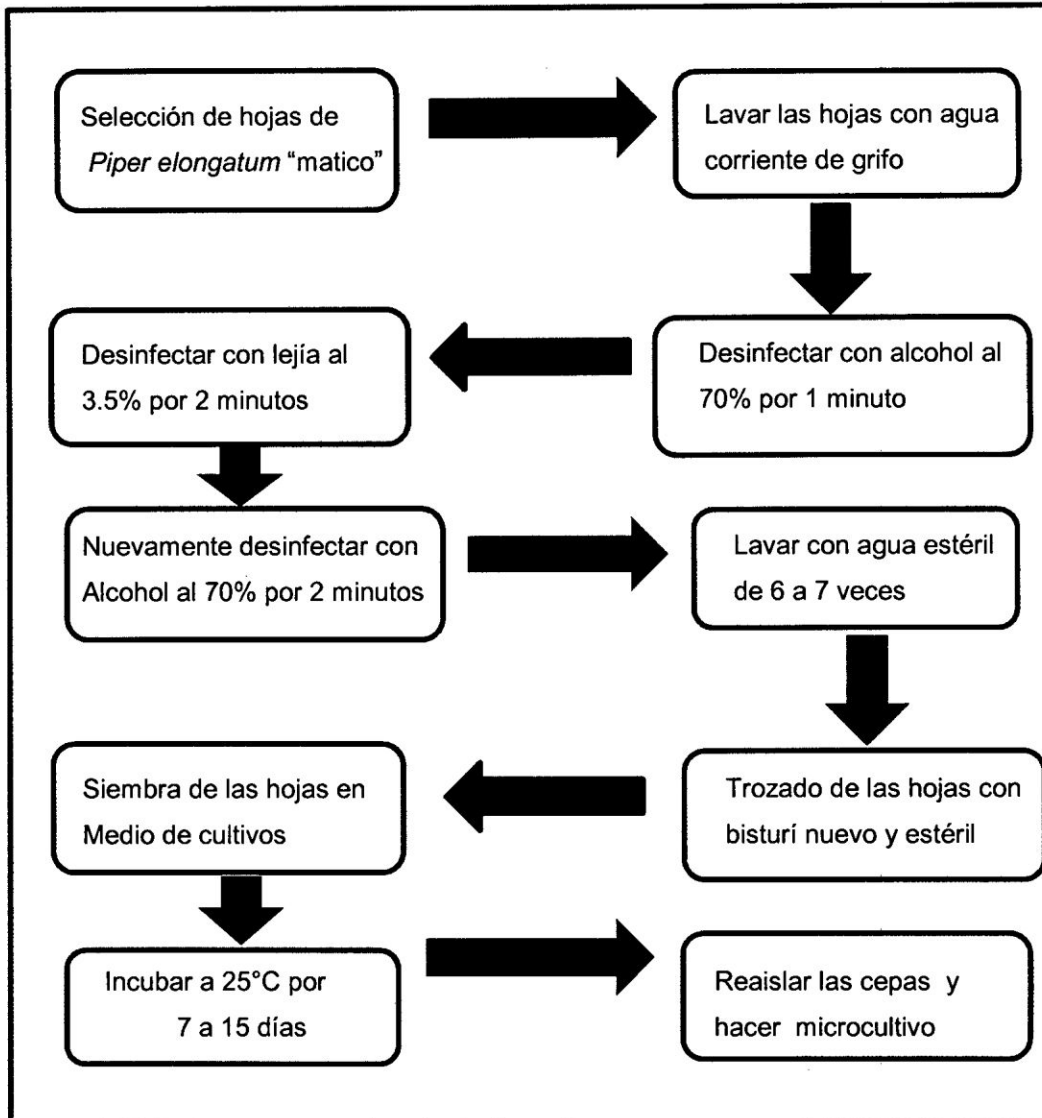
https://www.google.com.pe/?gfe_rd=cr&ei=S1AbVInoFZHDqAWH5oDABw#q=metabolitos+secundarios+de+hongos+fitopatogenos

50. Nieto I. Estudio químico del extracto en acetato de etilo del Hongo comestible *Laccaria laccata*. Tesis de Maestría en Ciencias – Química, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Bogotá. 2007 [Revista en internet]. 2008. 12 enero [acceso 23 junio 2014]. 6, 45–47. Disponible:

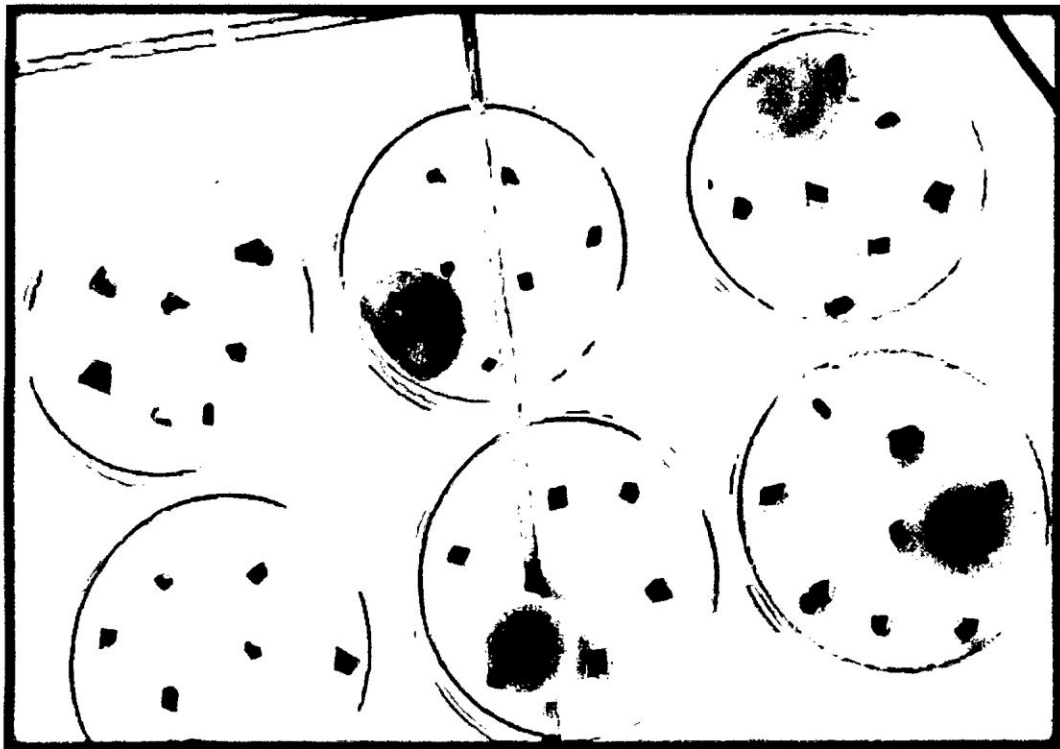
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v36n3/v36n3a01>

IX. ANEXO

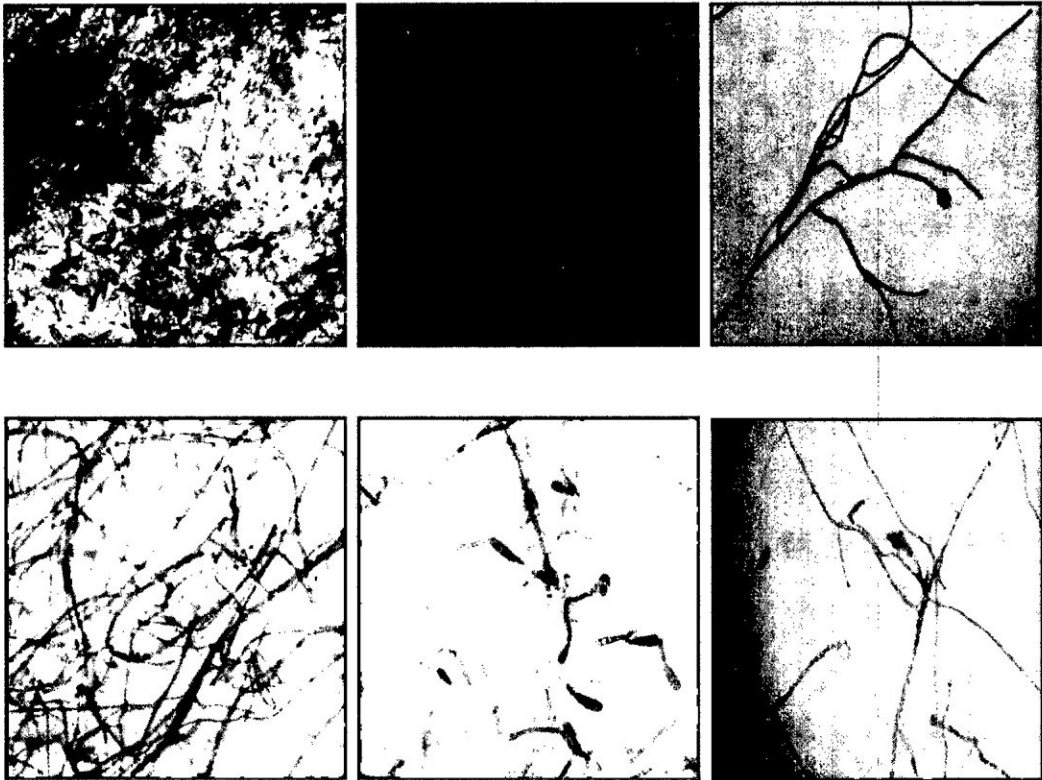
Anexo 1. Flujograma del aislamiento e identificación de hongos endofíticos de las hojas de *Piper elongatum* "matico", en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de ciencias Biológicas. Ayacucho 2013



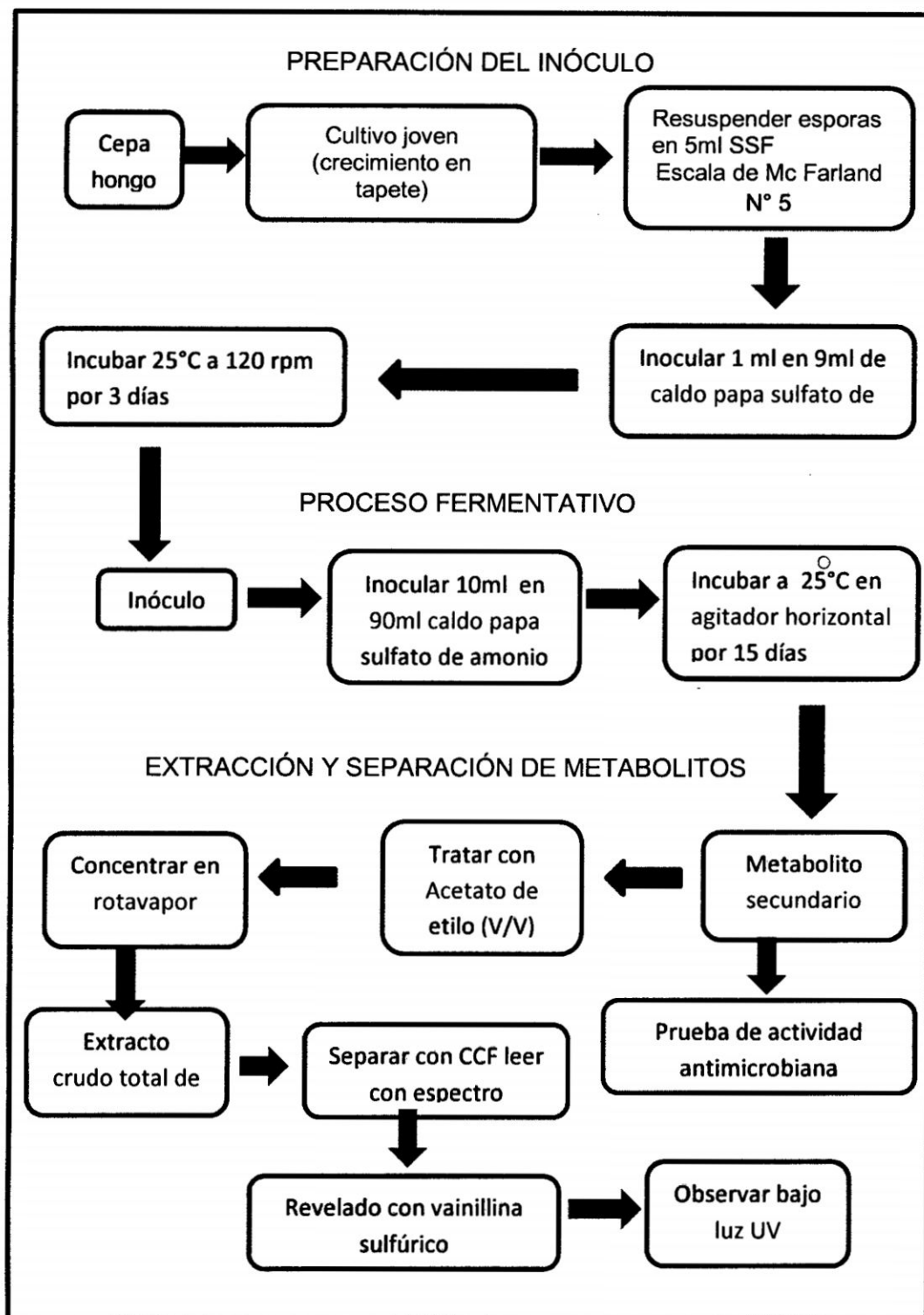
Anexo 2. Crecimiento de las colonias de hongos endofíticos aislados de las hojas de *Piper elongatum* "matico" Ayacucho 2013



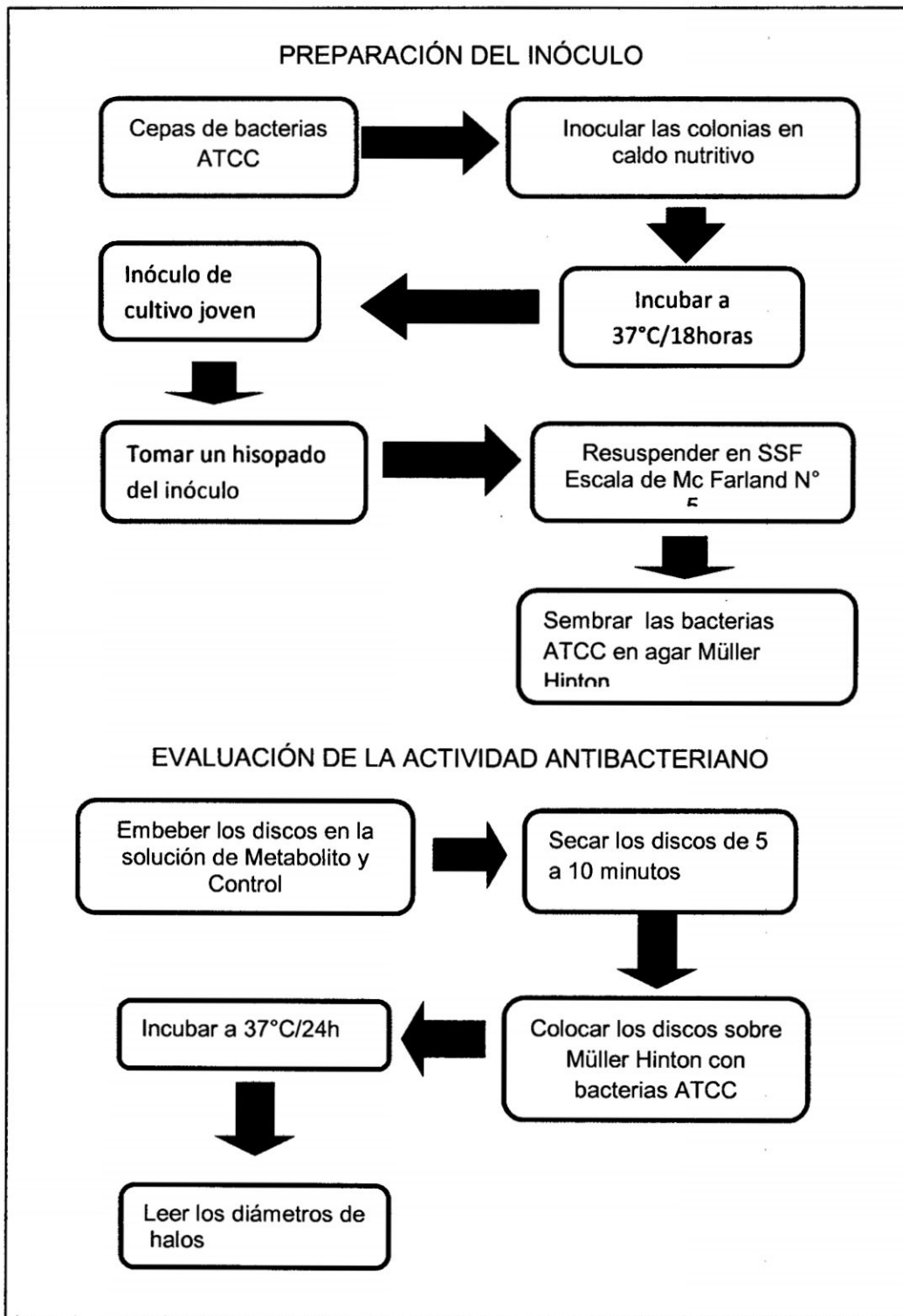
Anexo 3. Observación microscopicas de hongos endofíticos aislados de las hojas de *Piper elongatum* "matico" Ayacucho 2013



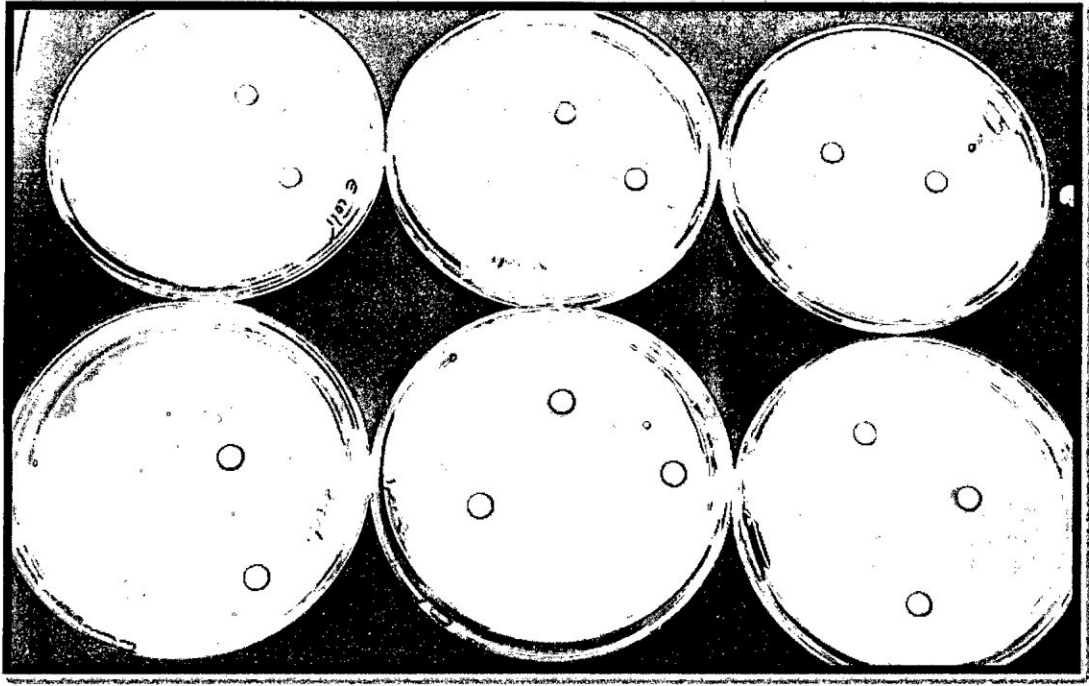
Anexo 4. Flujograma para la producción y separación de metabolitos secundarios de los hongos endofíticos aislados de las hojas de *Piper elongatum* "matico", en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de ciencias Biológicas. Ayacucho 2013



Anexo 5. Flujoograma de la actividad antibacteriana de los discos con metabolitos secundarios de hongos endofíticos. Ayacucho 2013



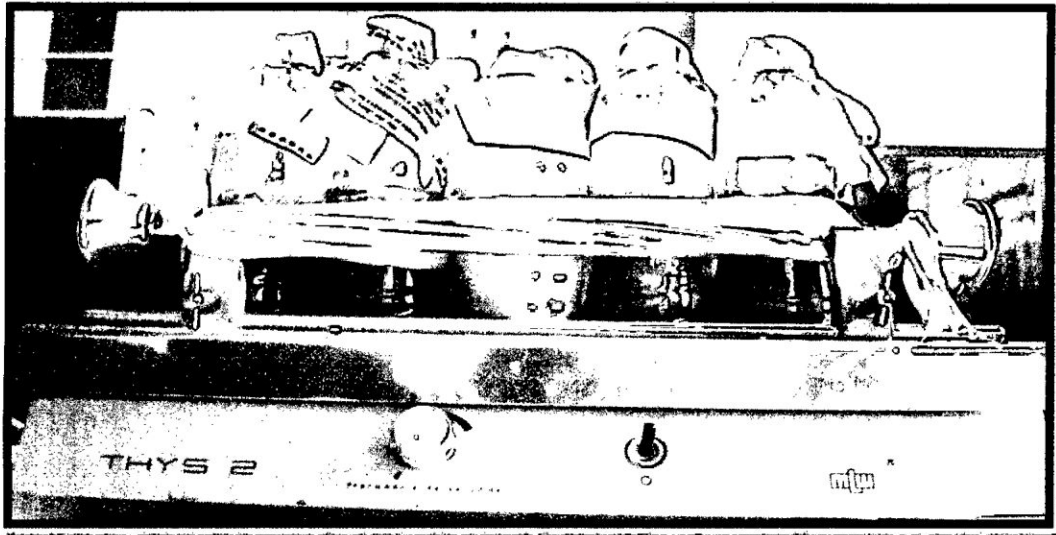
Anexo 6. Formación de halos de inhibición de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos frente a bacterias patógenas; *Escherihia coli* INS – 4672 y *Estaphylococcus aureus* ATCC- 6803, prueba de difusión en discos. Ayacucho 2013



Anexo 7. Tamizaje fitoquímico según el modelo de Miranda (2002)

Metabolito secundario	Prueba o ensayo	Resultados
Alcaloides	dragendorff	
Alcaloides	Mayer	Formación de precipitados
Alcaloides	Wagner	
Lactonas y camarinas	Baljet	Formación de coloración roja
Flavonoides	Shinoda	Coloración amarilla, naranja, carmelita o roja en la fase amílca
Quinonas	Borntrager	Fase amílca es de color rojizo o rosada
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV indica ensayo positivo
Saponinas	Espumas	Formación de espuma en la superficie
Azúcares reductores	Fehling	Formación de precipitado rojo ladrillo
Taninos y fenoles	Cloruro férrico	Formación de coloración negruzca
aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Coloración azul violáceo
Cardenolidos	Keede	Coloración violáceo
Resinas	Resinas	Formación de precipitado

Anexo 8. Fermentaciones (a) y formación de conidios (b) de hongos endofíticos, aislados de *Piper elongatum* "matico" con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenos Ayacucho, 2013

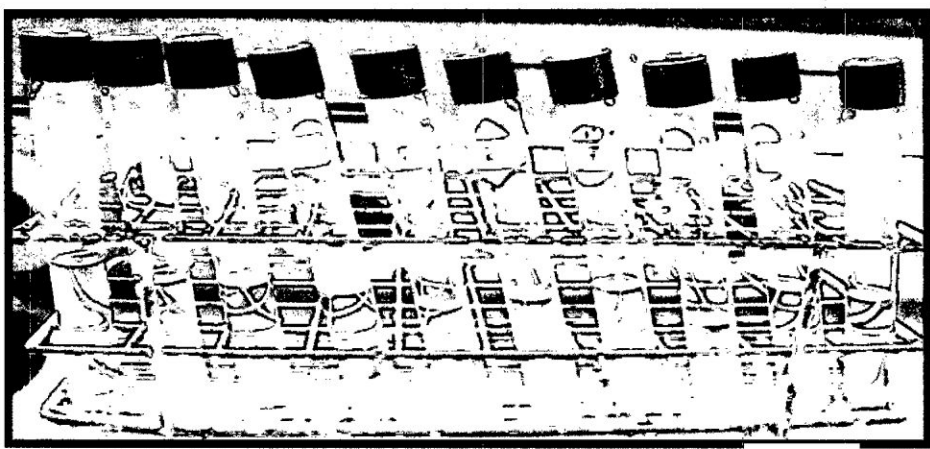
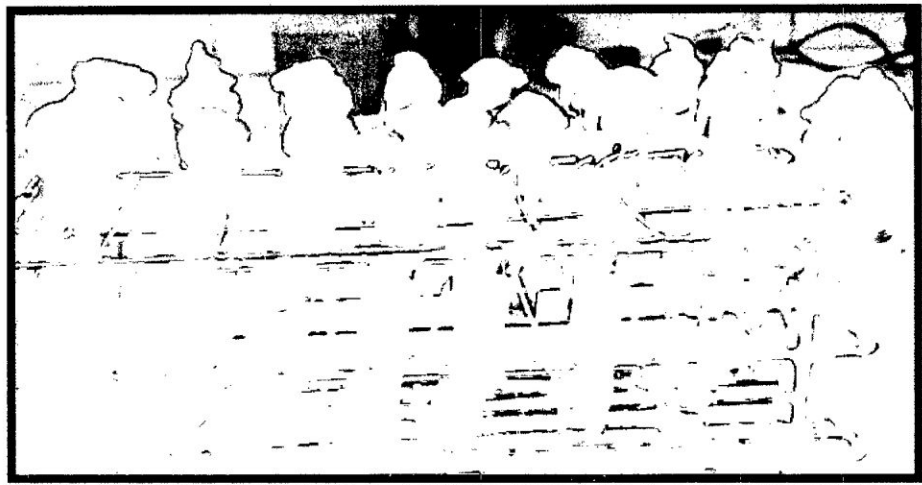


(a)

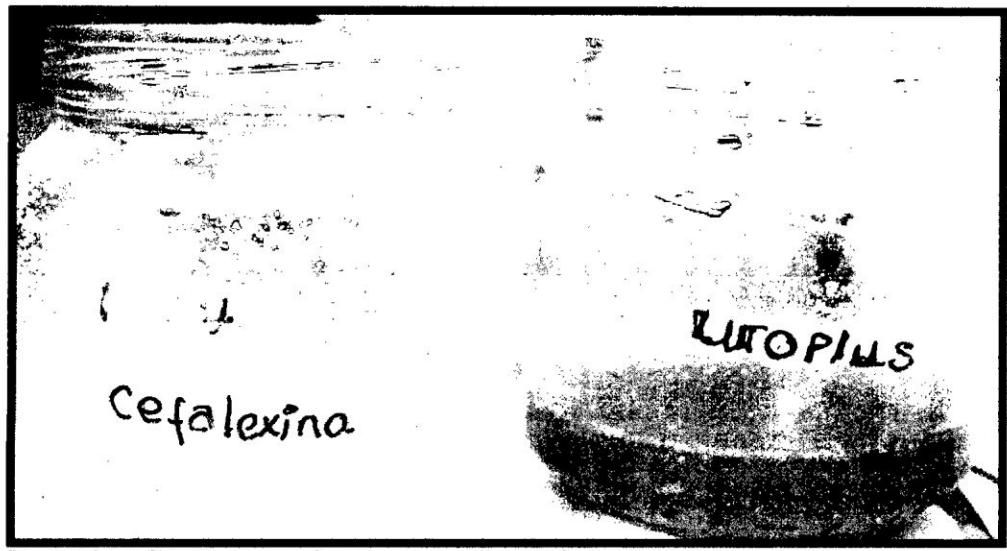


(b)

Anexo 9. Comparación de las cepas bacterianas patógenas con la Escala de Mac Farland. Ayacucho 2013



Anexo 10. Muestra de controles (a) y metabolitos (b), utilizados para la prueba de difusión de discos. Ayacucho 2013



(a)

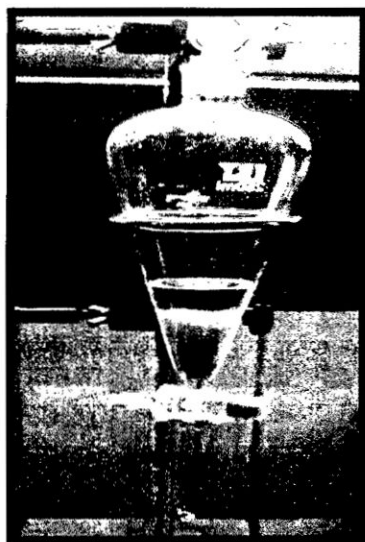


(b)

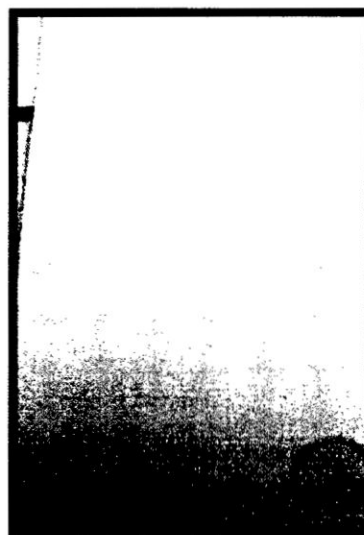
Anexo 11. Concentración en rotavapor para extracción de metabolito en AcOEt, realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de ciencias Biológicas. Ayacucho 2013



Anexo 12. Sistema de solvente butanol ácido acético glacial agua (4:5:1) (a), Inyección de los metabolitos sobre cromatografía de capa fina silica gel G 60 en soporte de aluminio (b), Separación de los metabolitos utilizando BAW como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de ciencias Biológicas. Ayacucho 2013.



(a)



(b)

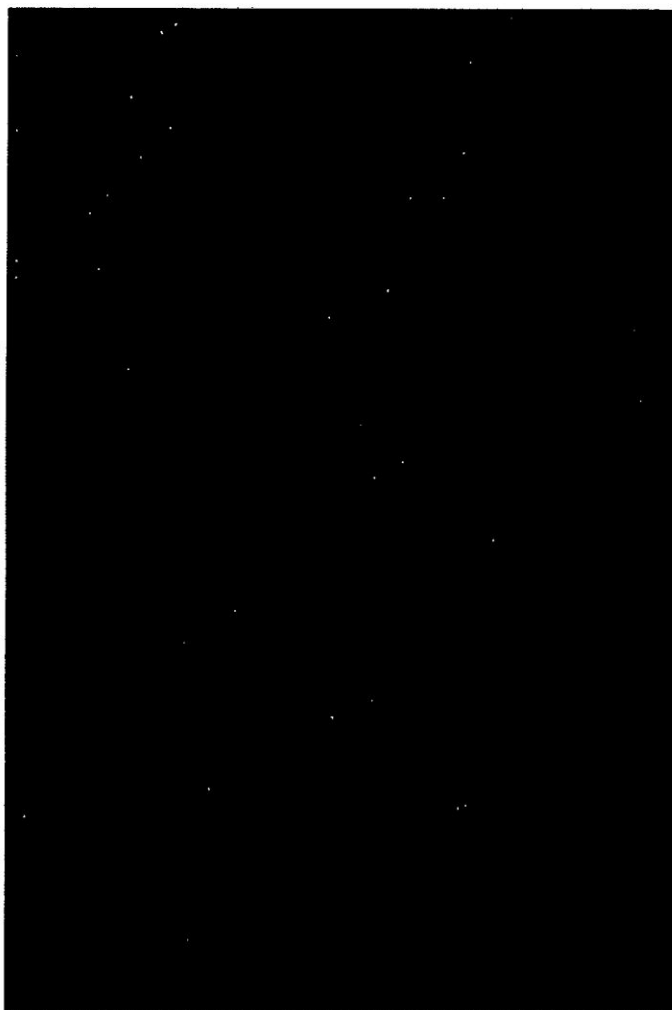


(c)

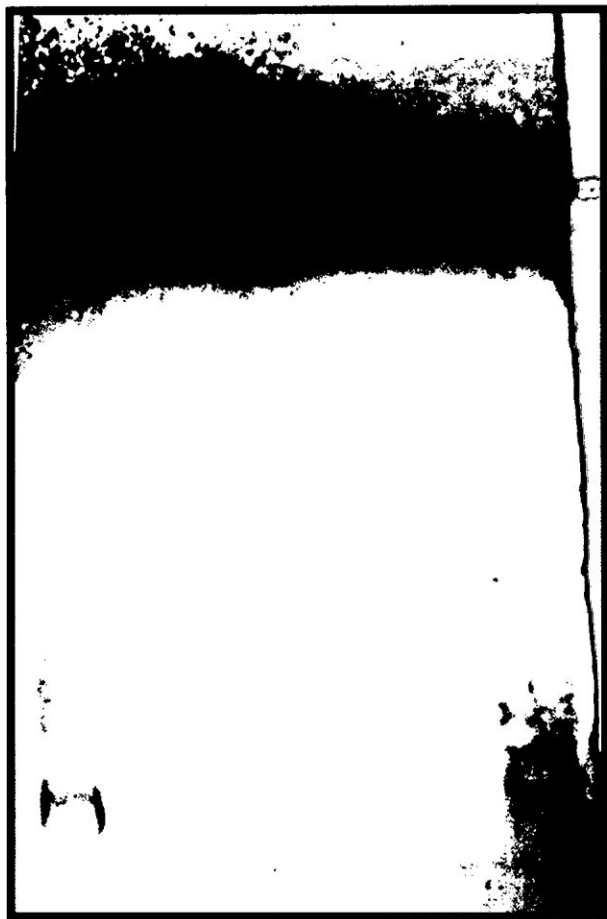
Anexo 13. Observación en lámpara UV de la Separación de los compuestos utilizando BAW como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2013



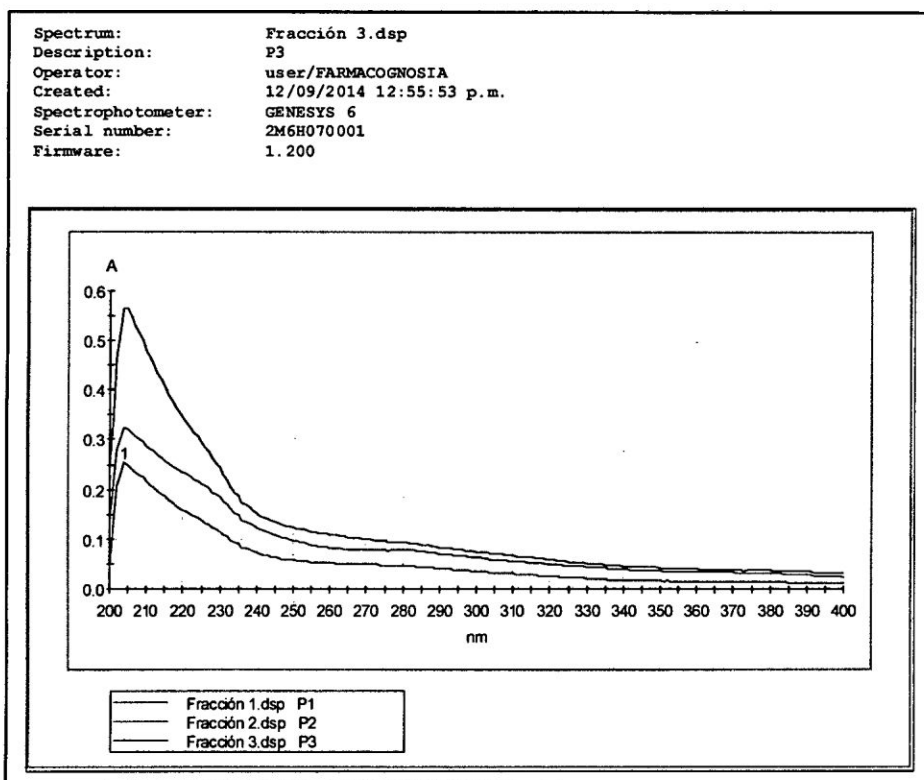
Anexo 14. Observación en lámpara UV de la Separación de los compuestos utilizando $\text{CHCl}_3\text{-CHOH}$ como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2013



Anexo 15. Observación del revelado con vainillina sulfúrico de la Separación de los compuestos utilizando $\text{CHCl}_3\text{-CHOH}$ como sistema de solvente realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2013



Anexo 16. Curva espectral al ultra violeta de los compuestos separados por cromatografía. Ayacucho 2013

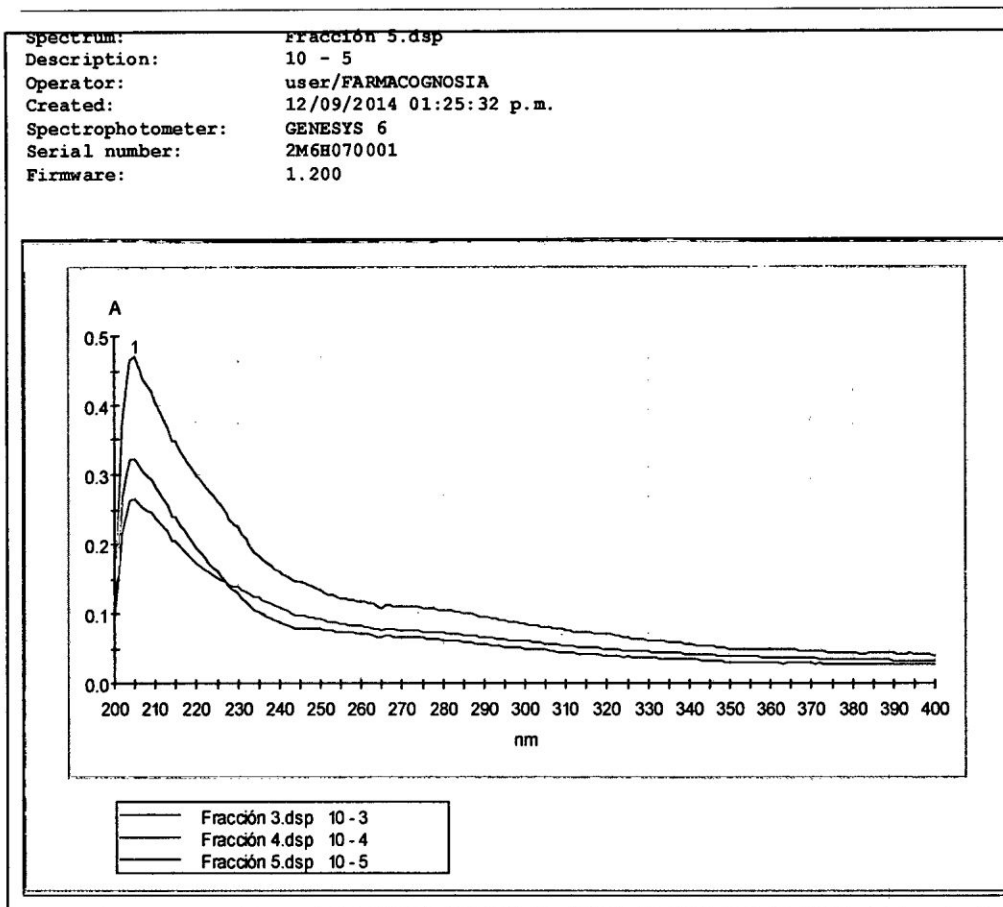


Fracción 1.dsp P1
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.566 A

Fracción 2.dsp P2
Maxima Threshold: 0.01 A
1 204 nm; 0.325 A

Fracción 3.dsp P3
Maxima Threshold: 0.01 A
1 204 nm; 0.254 A

Continuación del anexo 16. Curva espectral al ultra violeta de los compuestos separados por cromatografía. Ayacucho 2013

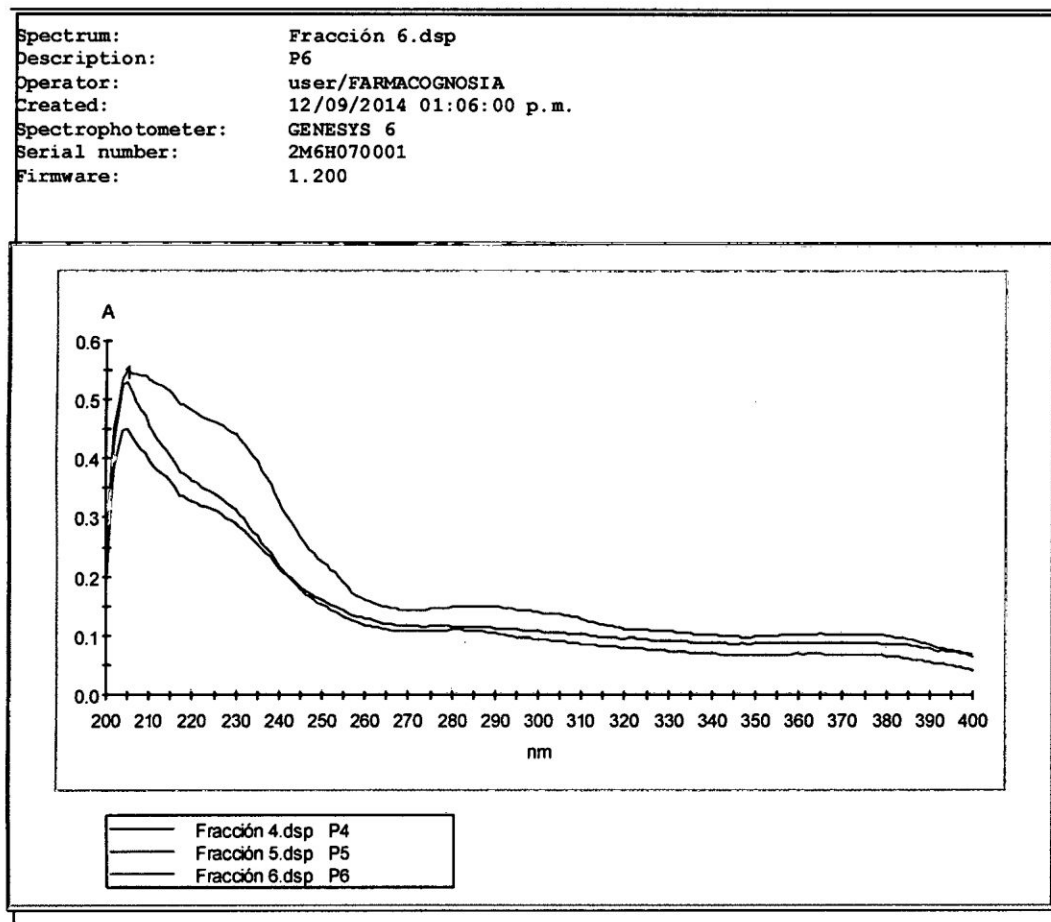


Fracción 3.dsp 10 - 3
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.323 A

Fracción 4.dsp 10 - 4
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.266 A

Fracción 5.dsp 10 - 5
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.470 A

Continuación del anexo 16. Curva espectral al ultra violeta de los compuestos separados por cromatografía. Ayacucho 2013.



Fracción 4.dsp P4
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.451 A

Fracción 5.dsp P5
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.551 A

Fracción 6.dsp P6
Maxima Threshold: 0.01 A
1 205 nm; 0.530 A

Anexo 17. Número de colonias y géneros de hongos endofíticos aislados de *Piper elongatum* "matico". Ayacucho 2013.

	CÓDIGO	N° DE COLONIAS	CARACTERÍSTICA CULTURAL	GÉNERO
APD	V1GA6	6	Blanco plumizo, algodonoso inverso pardo oscuro	<i>Alternaria</i>
APD	V1GP3	3	Color verde oscuro, parte central bordes blancos	<i>Penicillium</i>
AS	V1CP1	1	Borde blanco y con centro de color verde pulverulento	<i>Penicillium</i>
AS	V1CA3	3	Blanco plumizo, algodonoso inverso pardo oscuro	<i>Alternaria</i>

MEDIO	CÓDIGO	N° DE COLONIA	CARACTERÍSTICA CULTURAL	GÉNERO
APD	B2LA5	5	Blanco algodonoso inverso negro.	<i>Alternaria</i>
APD	B2LX1	1	Blanco algodonoso transparente inverso blanco.	<i>Aspergillus</i>
APD	B2LP4	4	Verde central, con bordes blanco inverso blanco.	<i>Penicillium</i>
AS	B2SA4	4	Plomo algodonoso inverso negro.	<i>Alternaria</i>
AS	B2SP3	3	Verde pulverulento, con borde blanco inverso blanco.	<i>Penicillium</i>

Anexo 18. Porcentajes de aislamientos de hongos endofíticos en función de los números de muestreos realizados a la planta del *Piper elongatum* "matico" Ayacucho, 2013

MUESTRA	N° TOTAL DE COLONIAS	%
M1	13	18,84
M2	17	24,64
M3	17	24,64
M4	22	31,88
TOTAL	69	100

Anexo 19. Número de cepas de hongos endofíticos aislados a partir de hojas de *Piper elongatum* "matico" en función al tipo de medio de cultivo utilizado. Ayacucho, 2013

MEDIO	MUESTRA	CEPAS	N° DE COLONIAS	%
Agar Papa Dextrosa	M1	Alternaria/Penicillium	9	13.04
	M2	Alternaria/Penicillium/Aspergillus	10	14.50
	M3	Alternaria/Penicillium	12	17.40
	M4	Alternaria/Penicillium/Aspergillus	13	18.84
Agar Sabouraud	M1	Alternaria/Penicillium	4	5.80
	M2	Alternaria/Penicillium	7	10.14
	M3	Alternaria/Penicillium	5	7.24
	M4	Alternaria/Penicillium/Aspergillus	9	13.04
TOTAL			69	100

Anexo 20. Composición del medio de cultivo caldo papa sulfato de amonio.
Ayacucho – 2013

COMPOSICIÓN g/l	CANTIDAD
Extracto de papa	400 ml
glucosa	20 g
sulfato de amonio	3 g

Anexo 21. *Piper elongatum* "matico". Ayacucho -2013



**Anexo 22. Certificado de la identificación taxonómica de *Piper elongatum*
"matico"**



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

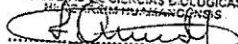
C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Ciencias Biológicas, Sr. Luis Gonzalo, LA TORRE TORRES,
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.
Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	MAGNOLIIDAE
ORDEN	:	PIPERALES
FAMILIA	:	PIPERACEAE
GENERO	:	Piper
ESPECIE	:	<i>Piper elongatum</i> L.
N.V.	:	"matico"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado
para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 19 de Noviembre del 2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Biga. Laura Aucasime Medina
JEFE

Anexo 23. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLE E INDICADORES	METODOLOGÍA
Estudio químico preliminar y evaluación de la capacidad antibacteriana de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico".	¿cuál será la capacidad antibacteriana de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico".	Objetivos generales Realizar el estudio químico preliminar de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico".	Antecedente botánicos Sistémica del <i>Piper elongatum</i> "matico". Descripción botánica Distribución y hábitat. Componentes activos Los hongos. Hongos endofíticos. Metabolito secundario. Metabolito microbiano. Características de los metabolitos	Los componentes químicos producidos por hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico" tienen actividad antibacteriana.	Variable independiente: Componentes químicos de hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico" Indicadores Coloración Precipitación Variable dependiente Actividad antimicrobiana Indicadores Diámetro de halo Numero de colonias.	Población Hongos endofíticos presentes en hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico" Tamaño de muestra Hongos endofíticos presentes en 500g de hojas de <i>Piper elongatum</i> "matico" Selección de la muestra Diseño experimental Desinfección de la muestra Aislamiento de hongos endofíticos Identificación de los hongos Pruebas antibacterianas Estudio químico
de los metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico".	Objetivos específicos Aislar e identificar hongos endofíticos de <i>Piper elongatum</i> "matico".					
hongos endofíticos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico"	Realizar las fermentaciones fúngicas de endófitos aislados de <i>Piper elongatum</i> "matico", para la obtención de metabolitos secundarios.	Realizar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios producidos por endófitos aislados de <i>Piper elongatum</i> contra bacterias patógenas.	Fermentaciones. Fermentaciones microbianas. Antagonismo microbiano Antibiosis, competencia			
<i>Piper elongatum</i> "matico"						
Ayacucho-2013						