



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL
EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE *Piper peltatum* SOBRE
HIALURONIDASA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ARIEL BENJAMIN TORRES AGUILAR

DIRECTORA: BQF. GISELA PILCO BONILLA, M.sc.

RIOBAMBA-ECUADOR

2018

©2018, Ariel Benjamín Torres Aguilar

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación: Tipo trabajo experimental “COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE *Piper peltatum* SOBRE HIALURONIDASA ” de responsabilidad del señor Ariel Benjamín Torres Aguilar, ha sido minuciosamente revisados por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Gisela Pilco Bonilla, M.sc

DIRECTORA DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Diego Vinuesa Tapia, M.sc

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo ARIEL BENJAMIN TORRES AGUILAR soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Ariel Benjamin Torres Aguilar
210063502-4

DEDICATORIA

A mis padres Gabriel y Delfa que con su esfuerzo y sacrificio me han educado. Por haberme brindado las herramientas necesarias para culminar mis estudios.

A mis hermanos Nidia a Paul y Leonardo quienes son mi mayor motivación para poder cumplir mis sueños. A toda mi familia y amigos quienes me han apoyado con sus consejos y su buena voluntad.

Ariel.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme brindado la oportunidad de culminar mis estudios.

Agradezco a mis padres, familia y amigos quienes me han apoyado a lo largo de mis estudios.

Al colaborador BQF. Diego Vinueza quien me ha instruido y guiado en la realización de este proyecto de investigación.

A mi tutora BQF. Gisela Pilco quien me ha brindado su apoyo y guía.

Ariel

ABREVIATURAS

M= Metros

Cm= Centímetros

mm= Milímetros

HCT-8= Células cancerígenas carcinoma de colon.

SF-295= Células Tumorales del sistema nervioso central

LH-60= Células de leucemia mieloblástica humana.

AH= Ácido Hialurónico

g= Gramos

L= Litros

Kg= Kilogramos

PLA2= Fosfolipasa A2

SVMP= Metaloproteinasas de veneno de serpiente

3-FTx= Toxina de tres dedos

SVSP= Serina proteinasas de veneno de serpiente

CTL= Lectinas de tipo C

pH= Potencial Hidrogeno

ADNc= ADN complementario

TIM= β/α triosa fosfato isomerasa

ELISA= Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas

mM= milimol

M= mol

mL= Mililitro

μ L= micro Litro

DMSO= Dimetil sulfóxido

USP= United States Pharmacopeal

ppm= Partes por millón

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	XV
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO I	
1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1 Características del Género Piper	5
1.2 Especie <i>Piper Peltatum</i>	5
1.2.1 Zonas de Distribución	6
1.2.2 Organización taxonómica	6
1.2.3 Observaciones Taxonómicas	6
1.2.4 Uso tradicional:	6
1.2.5 Usos farmacológicos	7
1.3 Ácido hialurónico	7
1.3.1 Importancia cosmetológica	8
1.3.2 Papel que desempeña el ácido hialurónico en la matriz extracelular	8
1.3.3 Espacio Extracelular	9
1.3.4 Función que desempeña el ácido hialurónico en la matriz extracelular	9
1.4 Proceso de cicatrización	9
1.4.1 Etapa inflamatoria	10
1.4.2 Etapa de fibroblastos	10
1.4.3 Etapa de maduración, envejecimiento y reconstrucción	11
1.5 Veneno de serpiente	11
1.5.1 Veneno de cobra <i>Naja Atra</i>	12
1.5.2 Veneno de <i>Bothrops Atrox (equis)</i>	12
1.6 Hialuronidasa	12
1.6.1 Clasificación de la Hialuronidasa	13

1.6.2	<i>Estructura</i>	14
1.6.3	<i>Actividad</i>	14
1.6.4	<i>Mecanismo</i>	15
1.6.5	<i>Compuestos inhibidores de la hialuronidasa</i>	16

CAPITULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	17
2.1	Zona de recolección de la especie vegetal	17
2.2	Lugar de estudio	17
2.3	Materiales y equipos	17
2.4	Técnicas y Métodos	19
2.4.1	<i>Etapa de preparación de la materia prima</i>	19
2.4.2	<i>Análisis del control de calidad de la materia prima</i>	19
2.4.3	<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	22
2.4.4	<i>Realización del extracto hidroalcohólico de Piper peltatum</i>	28
2.4.5	<i>Análisis de calidad del extracto hidroalcohólico</i>	28
2.4.6	<i>Método Folin-Ciocalteu para cuantificar compuestos fenólicos</i>	30
2.4.7	<i>Cuantificación de flavonoides</i>	31
2.4.8	<i>Evaluación de la actividad inhibitoria</i>	31

CAPITULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS ..	34
3.1	Análisis de atributos de calidad del extracto de la especie vegetal	34
3.2	Tamizaje Fitoquímico	35
3.3	Control de calidad del extracto alcohólico	36
3.4	Cuantificación de fenoles en el extracto por el método de Folin-Ciocalteu	36
3.5	Cuantificación de flavonoides Totales en el extracto	37
3.5.1	<i>Inhibición de hialuronidasa bovina</i>	38

3.6	Análisis de resultados de la inhibición de la hialuronidasa en los venenos de serpiente.....	39
3.7	Análisis estadístico	43
	CONCLUSIONES.....	46
	RECOMENDACIONES:	47
	BIBLIOGRAFIA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Clasificación taxonómica de la especie vegetal <i>Piper peltatum</i>	6
Tabla 2-2 Materiales usados en el análisis de calidad de materia prima.....	17
Tabla 3-2 Materiales usados en el Tamizaje Fitoquímico.....	17
Tabla 4-2 Materiales usados en el análisis de calidad del extracto	18
Tabla 5-2 Reactivos e implementos usados en la cuantificación de fenoles y flavonoides	18
Tabla 6-2 Reactivos e implementos usados en la prueba de inhibición de la hialuronidasa bovina.....	18
Tabla 7-2 Reactivos e implementos usados en inhibición de la hialuronidasa en el veneno de serpiente	19
Tabla 8-2 Elaboración del proceso de inhibición de la hialuronidasa bovina a diferentes concentraciones de la especie <i>Piper Peltatum</i>	32
Tabla 9-2 Elaboración del proceso de inhibición de la hialuronidasa en el veneno de serpiente a diferentes concentraciones de la especie <i>Piper peltatum</i>	33
Tabla 10-2 Resultados del análisis de calidad del extracto de la muestra vegetal	34
Tabla 11-3 Resultados de la realización del tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>Piper peltatum</i>	35
Tabla 12-3 Resultados del control de calidad del extracto de hojas de <i>Piper peltatum</i>	36
Tabla 13-3 Resultados de la cuantificación de fenoles en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Piper peltatum</i>	37
Tabla 14-3 Resultados de la cuantificación de flavonoides	37
Tabla 15-3 Resultados de la inhibición de la hialuronidasa.....	38
Tabla 16-3 Porcentajes de inhibición de la hialuronidasa en	39
Tabla 17-3 Absorbancias de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra.....	40
Tabla 18-3 Absorbancias de las inhibiciones de la hialuronidasa del veneno de <i>Bohtrops atrox</i> a diferentes concentraciones.....	42
Tabla 19-3 Análisis estadístico test de Fisher	43
Tabla 20-3 Evaluación de diferencias significativas Test de Tukey	43
Tabla 21-3 Diferencias significativas.....	44
Tabla 22-3 Diferencias significativas de las concentraciones en función de todos	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1 Mecanismo de acción de la enzima hialuronidasa	16
Figura 2-2 Cuadro de preparación de los extractos para la obtención de compuestos fitoquímicos.	23
Figura 3-2 Diagrama de ensayos del extracto acuoso.....	23
Figura 4-2 Diagrama de los ensayos del extracto alcohólico.....	24
Figura 5-2 Diagrama de los ensayos del extracto acuoso	24

ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico 1-3 Curva de los porcentajes de inhibición de la hialuronidasa bovina a diferentes concentraciones de <i>Piper Peltatum</i>	39
Gráfico 2-3 Curvas de los porcentajes de inhibición de la hialuronidasa de los venenos de serpiente <i>Naja Naja Atra</i> y <i>Bothrops atrox</i>	40
Gráfico 3-3 Regresión cuadrática de segundo orden de las absorbancias de la inhibición de la hialuronidasa de <i>Naja naja atra</i>	41
Gráfico 4-3 Regresión cuadrática de segundo de orden del veneno de las absorbancias de la hialuronidasa de <i>Bothrops atrox</i>	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Preparación del tamizaje fitoquímico

ANEXO B: Análisis de calidad del extracto

ANEXO C: Inhibición de la hialuronidasa

ANEXO D: Guía de movilización de la especie vegetal

ANEXO E: Certificado de identificación de la especie vegetal

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue comprobar la actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Piper Peltatum* sobre la hialuronidasa. Se efectuó la recolección de la materia vegetal y se analizaron los parámetros de calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico. Mediante el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides. De igual forma con los métodos colorimétricos se cuantificó los compuestos fenólicos y flavonoides. Se empleó diferentes concentraciones del extracto vegetal (1000; 250; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para las pruebas de inhibición de la hialuronidasa; se utilizó un grupo control de máxima actividad enzimática y un blanco negativo. Se determinó que el mejor resultado en la inhibición de la hialuronidasa bovina fue a la concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un 81,13% de inhibición; los resultados más relevantes se obtuvieron frente a los venenos de serpiente cobra (*Naja naja*) a concentraciones más diluidas 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con un 40,17% de inhibición mientras que en la especie *Bothrops atrox* la actividad fue menos significativa a concentración de 12,5 con un 24,7% de inhibición. La diferencia en el porcentaje de inhibición puede darse por la variabilidad genética de las dos especies, y la cantidad de hialuronidasa presente en el veneno. Es recomendable realizar esta investigación con venenos de otras de serpientes debido a su uso tradicional en las mordeduras.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <INHIBICIÓN DE HIALURONIDASA (Enzima)>, <VENENO DE COBRA (*Naja naja*)>, <VENENO DE EQUIS (*Bothrops atrox*)>, <SANTA MARÍA (*Piper peltatum*)>.

ABSTRACT

The objective of the research was to verify the inhibitory activity of the hydroalcoholic extract of *Piper peltatum* on hyaluronidase. The vegetal matter was collected and the crude drug and the hydroalcoholic extract quality parameters were analyzed. Through the photochemical screening, the presence of alkaloids, terpenes, phenols and flavonoids were determined. In the same way with the colorimetric methods, the phenolic and flavonoid compounds were quantified. Different contractions of the plant extract (1000; 250; 100; 50; 25; 12,5 y 6,25 µg/mL) were used for hyaluronidase inhibition test; a control group of maximum enzymatic activity and a negative target was used. It was determined that the best result in the inhibition of bovine hyaluronidase was at the concentration of 250 µg/mL with 81.13% inhibition; the most relevant results were obtained against snake venom cobra (*Naja naja*) at concentrations and more diluted 6,25 µg/mL with a 40,17% inhibition while in the *Bothrops atrox* species the activity was less significant at the concentration of 12,5 with 24,7% inhibition. The difference between the percentages of inhibition can be given by the genetic variability of the two species, and amount of hyaluronidase present in the venom. It is advisable to perform this investigation with venom from other snakes due to its traditional use in bites.

Key Words: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACOLOGY>, <INHIBITION OF HYALURONIDASE (ENZIME)>, <VENOM OF COBRA (*Naja naja*)>, <VENOM OF X (*Bothrops atrox*)>, <SANTA MARIA (*Piper peltatum*)>.

INTRODUCCIÓN

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador considera a las mordeduras de serpientes como accidentes ofídicos. En la mordedura de serpiente se forman dos punciones de 1-1.8 cm de ancho y se inyecta un veneno en la capa intra o subcutánea de la piel. La composición química del veneno es una mezcla de toxinas constituidas por proteínas enzimógenas como: enzimas proteolíticas, hialuronidasa, fosfolipasa A2, peptidohidrolasas, fosfodiesterasas y L- amino oxidasas (Mencías and Mayero, 2000, pp. 260-262).

La hialuronidasa ayuda a la propagación de la toxina a nivel local, mientras que las enzimas proteolíticas lesionan la estructura tisular subcutánea, el endotelio capilar dando lugar a la salida de plasma y eritrocitos. La hialuronidasa, la fosfolipasa y otras sustancias son alergógenas, es decir, ocasionan alergias a las personas que han sido mordidas por más de una vez por el mismo tipo de reptil (Mencías and Mayero, 2000, pp. 260-262).

La mordedura de serpiente afecta a un estimado de 5,4 millones de personas al año de estos 2,7 millones son envenados, ocasionando la muerte de 137 880 personas al año (World Health Organization, 2017).

En Ecuador se han reportado un total de 1411 casos de los cuales corresponde un 16,5% a Manabí y un 14,5% a Morona Santiago siendo las provincias mayormente afectadas. Es evidente entonces que la calidad de vida de la población se ve en peligro, sobre todo siendo las personas que laboran a nivel agrícola las más propensas a sufrir este tipo de accidentes (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2017, p.16).

Las lluvias y el desbordamiento de ríos motivan a los reptiles a bucar lugares más altos para resguardarse. Esta es la razón para encontrar reptiles en zonas donde las personas realizan sus actividades cotidianas por lo que accidentalmente las pisan y se produce la mordedura (Diario 'LA HORA', 2017).

Las manifestaciones clínicas en las mordeduras por serpientes venenosas, aparecen en las primeras 6 horas después de la mordedura. Los envenenamientos han sido clasificados por grados, tales como el grado 0 que indica que no existe riesgo para la salud y solo existen las huellas o marcas de los colmillos (Betancur, 2009, pp. 288-289).

- Grado I indica un ligero envenenamiento, con ligeros edemas.

- Grado II muestra un moderado envenenamiento con un edema marcado ocasionando dolor y alteraciones sistémicas leves.
- Grado III representa el grave envenenamiento, causa fuerte dolor, grandes edemas, sintomatología sistémica grave.

Los tratamientos empleados van acordes al grado de envenenamiento en el grado I se recomienda reposo, Grado 2 se usa analgésicos, grado 3 se usa suero antiofídico (Betancur, 2009, pp. 290-292).

El suero antiofídico es un producto de origen biológico, compuesto por una pequeña cantidad de veneno el cual va preparado con un coadyuvante y un aldehído que retarda su liberación, aumentando la respuesta inmune. El animal preferido para este proceso es el caballo se extrae de su sangre las inmunoglobulinas (Gómez, Gómez-Cabal and Gómez-Cabal, 2017, pp. 97-98).

El suero antifídico puede ser monovalente si se le suministra un solo tipo de veneno de serpiente o polivalente si se le suministra varios tipos de venenos. Con respecto al mecanismo de acción, éste impide que el sitio activo del veneno interactúe con su receptor y, por lo tanto, evita que se desencadenen los mecanismos fisiopatológicos de la intoxicación (Gómez, Gómez-Cabal and Gómez-Cabal, 2017, pp.97-98).

Pese haber sido descubierto hace más de cien años, su elaboración es muy difícil, ocasionando que no se pueda producir en muchos países, tal es el caso de Ecuador lo que genera un aumento del costo y dificulta el acceso al público.

El Ecuador es un país mega diverso posee una gran variedad de ecosistemas y según Steere (1950) es el país que posee el mayor número de especies por km² en Sudamérica. Cabe agregar que su flora consta entre 20000 y 25000 especies vegetales vasculares. Además, hay que considerar que la variedad de plantas no vasculares es altísima y se relaciona con la diversidad química por lo que han sido usadas tradicionalmente para diversas dolencias humanas e incluso a nivel fitocosmético (Varea *et al.*, 1997, pp.21-22).

Dentro de los usos comunes, las personas han empleado ciertas plantas como antídotos contra la mordedura de serpiente, por lo que específicamente los inhibidores de la hialuronidasa han llamado la atención científica, no solo por su interés farmacológico, sino también por su potencial cosmetológico (Ratnasooriya, Abeysekera and Ratnasooriya, 2014, pp.959-960).

De acuerdo con el plan nacional del buen vivir, en el objetivo tres se propone mejorar la calidad de vida de la población, velando por la salud y cambiando la matriz productiva del país, buscando nuevas fuentes de trabajo.

La especie vegetal *Piper peltatum* tiene una amplia distribución en el neotrópico se localizan comúnmente en tierras bajas de 300 a 1300 m. En la Amazonía se usa tradicionalmente desde las hojas hasta la raíz para tratar dolencias tales como la blenorragia, inflamaciones producidas por golpes, quemaduras, heridas, cortes, nariz tapada, dolor de muela, dolor de cabeza. Y como vermífugo, además como antídoto para mordeduras de serpiente. Considerando de esta manera, el potencial de esta planta (Bosio and Celestino, 1997,p.74)(Rios, 2007, pp.470-471).

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

Comprobar la actividad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Piper Peltatum* sobre la hialuronidasa

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los principales grupos fitoquímicos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Piper peltatum*.

Cuantificar fenoles totales y flavonoides por los métodos colorimétricos y de Folin- Ciocalteu.

Determinar la concentración de extracto con mayor actividad inhibitoria.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Características del Género Piper

El género Piper constituye uno de los más grandes al poseer aproximadamente 1000 especies. Se localizan en los Neotrópicos donde están alrededor de dos tercios de las especies. Existen dos especies autóctonas de África. En las zonas del sudeste de Asia, India Oriental y el Norte de Australia existen aproximadamente 300 especies.

Las especies de Piper se desarrollan mejor en los bosques húmedos, cálidos y zonas bajas. A medida que aumenta la elevación la diversidad disminuye (Dyer and Palmer, 2004, pp. 1-2).

Las especies del género Piper presentan características morfológicas uniformes, tales como hojas simples, alternas y tallos articulados con nudos agrandados. Las ramas se suelen romper con facilidad debido a los nudos. Por otra parte, los subtallos tienen haces vasculares dispersos en los tejidos maduros. La mayoría de sus especies son aromáticas, debido a que poseen células oleosas etéreas en sus tejidos (Dyer and Palmer, 2004, pp. 1-2).

1.2 Especie *Piper Peltatum*

Conocida como anisillo y/o santa maría. Es un subarbusto de madera blanca simple, con una altura de 0.6- 2.5m, el color de su tallo es verde pálido, los entre nudos tienen entre 2 a 11 cm de longitud y 4 a 8 mm de diámetro, glabros parcialmente pubérulos, lenticelados hacia la base (Bosio and Celestino, 1997, p.74).

Las hojas son membranáceas, verde opacas en el haz, verde pálidas en el envés, anchamente ovadas a suborbicuales, 15 a 45 cm de longitud, 15 - 25 cm de ancho, agudas a corto-acuminadas en el ápice, peltadas, el peciolo inserto en el tercer inferior de la lámina, de redondeadas a subcordadas en la base, hojas palmatinervadas, con 9-14 nervios surgiendo de la base (Bosio and Celestino, 1997, p.74).

1.2.1 Zonas de Distribución

Se encuentra distribuida ampliamente en el neotrópico, a menudo en bosques húmedos y terrenos bajos que comprende entre 300- 1300 m (Bosio and Celestino, 1997, p.74).

1.2.2 Organización taxonómica

Tabla 1-1 Clasificación taxonómica de la especie vegetal *Piper peltatum*

Clasificación Taxonómica	
Nombre Científico	<i>Piper Peltatum</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliosida
Orden	Piperales
Familia	Piperácea
Genero	<i>Piper</i>
Epíteto Especifico	<i>Peltatum</i>

Realizado por: Ariel Torres, 2017

1.2.3 Observaciones Taxonómicas

Las hojas peltadas y los ejes florígenos axilares, cortos, afilos y con numerosas espigas agrupadas, distinguen esta especie fácilmente de otras del mismo género (Bosio and Celestino, 1997, p.74).

Piper peltatum está relacionado con la *Piper umbellatum* que presenta tallos y hojas pubescentes y láminas no peltadas; las dos especies han sido segregadas bajo el género *Pothomorphe* Miq., existen otras especies de caracteres florales y vegetativos, tales como: *Piper marginatum* Jacq y *piper auritmon* H.B.K., en especial los márgenes estipulares blanquecinos y persistentes, la forma de las brácteas florales, el plano de dehiscencia de las anteras, la forma de la fruta y el fuerte olor a anís en toda la planta (Bosio and Celestino, 1997, p.74).

1.2.4 Uso tradicional:

En la región Amazónica se emplean las hojas frescas para frotarse la piel y evitar la picadura de mosquitos. Tanto las hojas como la raíz se emplean para el tratamiento de la blenorragia, también como vermífugos y para inflamaciones producidas por golpes, quemaduras o a nivel

dermatológico. Además presenta actividades antigripales, antiséptico y es usada en las mordeduras de serpientes

En Esmeraldas en las noches de luna llena se aplican las hojas de esta planta sobre el cuerpo de los niños traviesos mientras duermen, al despertar están tranquilos. Se usa las hojas en agua tibia y con esto bañan a los niños para que dejen de ser llorones. (Rios, 2007, pp.470-471).

Mientras que, en Manabí se utiliza para el tratamiento de la artritis. Con la infusión de la planta se realizan baños y se hacen emplastos en el lugar del dolor. En la provincia del Napo se emplea para el dolor de muela, dolor de cabeza, y Nariz tapada (Rios, 2007, pp.470-471).

1.2.5 Usos farmacológicos

El principal componente que se ha podido identificar es el 4-nerolidilcatecol, el cual ha sido usado en estudios contra las cepas de *Plasmodium falciparum* proporcionando pistas para el desarrollo de nuevos medicamentos. También se han probado otros compuestos derivados semisintéticos tales como mono-O-metil-metil, mono-O-bencilo que han sido capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de líneas celulares tumorales humanas del tipo HCT-8 (carcinoma de colon), SF-295 (sistema nervioso central), LH-60 (leucemia mieloblástica humana) (Puertas-mejia and Rojano, 2009 , pp.2-3) (Cristina *et al.*, 2009, pp.2731-2732).

1.3 Ácido hialurónico

Es una macromolécula biológica que pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos compuesta por disacáridos de ácido glucorónico y N-acetilglucosamina. Se comprobó su presencia en los principales procesos vitales como comunicación celular, migración, activación del metabolismo extracelular encontrándose en todos los tejidos del organismo, participando de la regulación de la actividad celular y de la matriz extracelular (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 1-6).

El ácido hialurónico cumple funciones de fertilización, embriogénesis, desarrollo de la respuesta inmune, curación de heridas, enfermedades oncológicas, procesos de envejecimiento y está siendo usado ampliamente en la medicina estética. Tiene de igual forma efectos antiinflamatorios, desinfectantes y cicatrizantes. Además ayuda en la regeneración epitelial; evita la formación de tejido granular y cicatrices, disminuye la hinchazón y picazón, normaliza la circulación sanguínea (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p. 59).

1.3.1 Importancia cosmetológica

El ácido hialurónico constituye principalmente la matriz extracelular de la dermis de la piel. Adicionalmente es muy hidrofóbico por lo que mantiene el agua unida conservando la piel lubricada, húmeda y lisa. La hialuronidasa es una enzima que despolimeriza el ácido hialurónico, ocasionando las arrugas de la piel (Ratnasooriya, Abeysekera and Ratnasooriya, 2014, pp.959-960).

El ácido hialurónico al ser capaz de retener el agua juega un rol importante en la reducción de arrugas, cicatrización y mantenimiento de la piel suave e hidratada (Liyanaarachchi *et al.*, 2018, p.598).

Cuando es hidrolizado el AH, la hialuronidasa disminuye la viscosidad de los fluidos corporales y aumenta la permeabilidad de los tejidos conectivos. Los agentes inhibidores de la enzima regulan y mantienen el equilibrio entre el anabolismo y catabolismo del AH, y esto mantiene la piel húmeda y lisa (Liyanaarachchi *et al.*, 2018, p.598).

El envejecimiento es una etapa de la vida humana y afecta a todos los sistemas del cuerpo incluyendo el sistema tegumentario. Existen dos tipos de envejecimiento, el primero es natural e intrínseco y empieza entre los 30-40 años de edad. El segundo es conocido como extrínseco y es producido por los rayos solares (ultravioleta) (Liyanaarachchi *et al.*, 2018, p.598).

1.3.2 Papel que desempeña el ácido hialurónico en la matriz extracelular

El ácido hialurónico se destaca principalmente por llenar la matriz extracelular en su estructuración a través de interacciones con proteínas. También desempeña una función importante en la hidrodinámica celular y tisular, el transporte de los compuestos en direcciones opuestas y el intercambio iónico (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.59).

Además, participa como “mediador estructural” durante la interacción celular creando canales para la migración en el intercambio activo entre los metabolitos, iones y gases con la sangre y los tejidos. El cuerpo de una persona adulta posee alrededor de 15 g de AH, encontrándose en mayor cantidad en la piel, líquido sinovial de las articulaciones, el globo ocular y tejidos conectivos (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.59).

1.3.3 Espacio Extracelular

Las células en gran parte están envueltas por una matriz extracelular, compuesta de una compleja red de macromoléculas interconectadas, entre estas el ácido hialurónico (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.60).

Se puede especular acerca del espacio intercelular por la distribución de líquidos del compartimento intercelular e intracelular. En base a esto, se deduce que el contenido de agua total de una persona adulta de 70 kg de peso es de aproximadamente 42 L y sin el plasma sanguíneo el volumen del fluido intracelular es de aproximadamente 28-30 L y del líquido intercelular de 10 L (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.60).

En el desarrollo embrionario del cerebro, la matriz extracelular contiene una gran cantidad de ácido hialurónico. No obstante, con el tiempo el contenido de la matriz extracelular se reduce de manera radical. El espacio extracelular contribuye al intercambio de los iones sodio- potasio entre las neuronas y medios extracelulares, y por lo tanto el impulso nervioso (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.60).

1.3.4 Función que desempeña el ácido hialurónico en la matriz extracelular

La matriz extracelular es el lugar donde se elaboran los biopolímeros y son transportados por los fibroblastos al espacio extracelular. Abarca además estructuras de proteínas fibrosas de colágeno y elastina, integradas en un gel hidratado de ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp.60-63).

Las macromoléculas de hialuronato junto con otros glicosaminoglicanos y proteoglicanos forman un gel muy hidratado llamado “sustancia básica” donde están sumergidas las fibras de colágeno. Las fibras de colágeno son las encargadas de reforzar y optimizar la matriz, y la fase acuosa del gel garantiza la difusión de metabolitos, gases, hormonas entre la sangre y las células de los tejidos (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp.60-63).

1.4 Proceso de cicatrización

En diversos estudios se ha podido identificar tres fases de cicatrización cutánea. La fase inicial es vascular e inflamatoria en donde se forma un coágulo de fibrina en la herida, a la vez que las células inflamatorias aseguran su limpieza. A continuación, se presenta la fase de la reconstrucción de los tejidos dérmicos y epidérmicos desencadenando la epitelización de la

herida. Por último se produce la fase de remodelación de la matriz extracelular con la maduración de la cicatriz (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p. 183).

1.4.1 Etapa inflamatoria

Con la finalidad de detener el sangrado se forma un coágulo de sangre compuesto de proteínas como fibrina y trombocitos. Los coágulos se forman a causa de la ruptura o daño de los vasos sanguíneos. Los trombocitos al descomponerse liberan diferentes factores de crecimiento, de igual forma lo hacen las proteasas responsables de descomponer la fibrina, apareciendo así moléculas de señal (polipéptidos) (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.183-184).

Los polipéptidos son los encargados de atraer a los monocitos, fibroblastos y neutrófilos. Se puede observar en la etapa inicial un aumento de la concentración del ácido hialurónico que se une a la fibrina, formando una matriz de transición. La macromolécula de AH posee segmentos hidrofóbicos que facilitan la intercomunicación entre las membranas de las células y las estructuras de la matriz (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp.183-184).

1.4.2 Etapa de fibroblastos

En esta etapa continua síntesis HA y proteoglicanos. También existe la participación activa de las metaloproteasas que catalizan la descomposición de las moléculas de la matriz extracelular. Las metaloproteasas dependen del Zinc para realizar su actividad y este elemento se encuentra en mayor cantidad en la piel (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 184-185).

La remodelación del tejido dañado depende de la interacción de los activadores de las enzimas y los inhibidores que afectan la creación de la matriz temporal. La segunda etapa de la curación de la herida se caracteriza por la proliferación activa de fibroblastos, la síntesis de una gran cantidad de ácido hialurónico y nuevo colágeno (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp.184-185).

Los fibroblastos de una persona adulta sintetizan colágeno tipo I. Mientras que los embriones durante las primeras etapas del desarrollo fetal producen colágeno tipo III y IV. El contenido de colágeno tipo III es más alto en la curación de heridas que el colágeno tipo I. Las células madre mesenquimales migran a la herida y se diferencian en fibroblastos jóvenes que producen colágeno tipo III y IV similar a los fibroblastos embrionarios (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp.184-185).

La formación de una nueva matriz extracelular equivale a la organización estructural y funcional de la matriz fetal. La membrana basal cumple un papel muy importante en la curación de heridas

de la piel, crea una plataforma para la migración celular y acelera la proliferación de células epiteliales (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 184-185).

1.4.3 Etapa de maduración, envejecimiento y reconstrucción

Cuando hay un exceso de matriz de colágeno, la cantidad de células se reduce por apoptosis. El ácido hialurónico al estar en demasía sufre una despolimerización y los fragmentos cortos de los polisacáridos estimulan la angiogénesis. La matriz temporal es destruida por la matriz de hialuronidasa y metaloproteasas en un proceso que es, esencialmente, una remodelación de la matriz temporal (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p. 185).

La hialuronidasa no solo hidroliza el HA sino que también separa el sulfato de condroitina de proteoglicanos. Los glicosaminoglicanos sulfatados en estado libre poseen propiedades únicas, reducen la actividad de las hialuronidasas y las enzimas proteolíticas en la matriz extracelular, bloquean la síntesis de mediadores de la inflamación enmascarando los determinantes antigénicos y la cancelación de la quimiotaxis, disminuyen la actividad de los radicales libres, evitan la apoptosis de las células, inhibe la síntesis de lípidos y evita los procesos de degradación en la curación (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, p.185).

Los linfocitos T, leucocitos y fibroblastos producen interferones que reducen la tasa de síntesis de colágeno. Como resultado de todo este proceso se logra la estabilidad deseada.

1.5 Veneno de serpiente

Una sola especie de serpiente es capaz de hacer un veneno con más de 100 componentes proteicos, los cuales pueden ser enzimáticos como no enzimáticos, posee de igual forma pequeños péptidos y otros compuestos orgánicos (Gopalakrishnakone and Calvete, 2016, p.53).

El envenenamiento por serpiente comprende la inyección intramuscular o subcutánea de veneno en las víctimas afectando tanto a nivel local como sistemático. Los efectos farmacológicos de la toxina incluyen cardiotoxicidad, neurotoxicidad, hemolisis, hemorragia y edema (Bala *et al.*, 2018, p. 6407).

Existen superfamilias de enzimas en el veneno tales como proteasas, acetilcolinesterasas, fosfolipasa A2 (PLA2), L-aminoácido oxidasas, hialuronidasas, fosfodiesterasas, serina proteinasas, metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMP) y toxina de tres dedos (3-FTx). (Gopalakrishnakone and Calvete, 2016, p.53).

Las enzimas hidrolíticas como las hialuronidasas y las metaloproteinasas hemorrágicas provocan el daño tisular local, así como la degradación de la matriz extracelular y el tejido conectivo que rodea los vasos sanguíneos. Estas proteínas conducen a la pérdida de la integridad estructural y facilitan la difusión de toxinas. Sin embargo, estas enzimas varían tanto en su contenido como en su acción en los diferentes venenos (Bala *et al.*, 2018, p.6407).

1.5.1 Veneno de cobra *Naja Atra*

La cobra China (*Naja atra*) es una de las especies más ampliamente distribuidas en ese país. Las mordeduras causadas por esta serpiente representan el 17% del total de accidentes ofídicos. Las personas que han sufrido una mordedura presentan síntomas a nivel local y sistémico, como heridas necróticas, raras veces hinchazón y sangrado, visión borrosa, taquipnea y arritmia. También puede llegar a sufrir insuficiencia renal, circulatoria y respiratoria (Shan *et al.*, 2016, p.83).

El veneno presenta entre los componentes más abundantes la toxina de tres dedos (3-FTx) y fosfolipasa A2 (PLA2). La 3-FTx es citotóxica y cardio tóxica (Shan *et al.*, 2016, p. 84).

1.5.2 Veneno de *Bothrops Atrox (equis)*

La víbora *Bothrops atrox* es una especie común en el Ecuador y está ampliamente distribuida debido a su gran capacidad adaptativa y alimentaria generalista. Además, es responsable de la mayoría de accidentes ofídicos (Bernardoni *et al.*, 2017, p.1).

El veneno está compuesto principalmente por fosfolipasa A2 (PLA2), serina proteinasas de veneno de serpiente (SVSP), lectinas de tipo C (CTL) y una alta prevalencia de metaloproteinasas de veneno de serpiente SVMP. Debido a esto, el envenenamiento provoca efectos tales como dolor, hemorragia, hinchazón y mionecrosis, alteraciones de la coagulación, coagulopatía consuntiva (Bernardoni *et al.*, 2017, p.1).

1.6 Hialuronidasa

La hialuronidasa es la enzima que degrada el hialuronato. La hialuronidasa es una enzima común en los venenos de serpiente e indirectamente inicia la toxicidad del veneno y puede ocasionar la destrucción del tejido local, en el lugar de la mordida o el colapso sistémico de la víctima envenenada (Bala *et al.*, 2018, p. 6407).

Las enzimas se encuentran en las secreciones de virus, hongos, bacterias, bacteriófagos, nematodos, sanguijuelas y en venenos de serpientes, escorpiones, abejas, avispa, avispones, arañas, orugas, anquilostomas, peces bacteriófagos, crustáceos, moluscos y lagartos. Así mismo en muchos animales que comparten características estructurales comunes, conservando todos los sitios para la actividad enzimática (Bala *et al.*, 2018, p. 6407).

Son un grupo expresado de forma ubicua de enzimas muy variantes que escinden naturalmente el ácido hialurónico que es un compuesto de alto peso molecular. Y algunas de estas enzimas tienen la capacidad de degradar glicosaminoglicanos a un ritmo más lento (Bala *et al.*, 2018, p. 6407).

El veneno que inyectan las serpientes está compuesto de proteínas tóxicas, tales como enzimas proteolíticas, hialuronidasa y fosfolipasa A2. La hialuronidasa ayuda a la difusión del veneno a través de los tejidos. Así mismo las enzimas proteolíticas lesionan las estructuras de las células subcutáneas ocasionando la fuga del plasma y eritrocitos (Mencías and Mayero, 2000, p.261).

Esta enzima también constituye el veneno de avispa y que en combinación con otros compuestos producen alergia en las personas (Mencías and Mayero, 2000, p. 261).

1.6.1 Clasificación de la Hialuronidasa

Según Meyer la Hialuronidasa se clasifica en tres tipos; de acuerdo al origen de la enzima, el tipo de reacción que produce y el producto final (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 86-87).

1.6.1.1 Tipo 1

Es la hialuronidasa de tipo testicular son las 4-glicanohidrosilasas de hialuronato que degradan al hialuronato por escisión del enlace β -1,4-glicosídico y se obtiene el tetrasacárido como producto principal (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 86-87).

- Tipo 1a. Hialuronidasa testicular, contenida en las glándulas seminales y los espermatozoides animales.
- Tipo 1b. Hialuronidasa lisosomal, se encuentra en los lisosomas de las diferentes células, suero sanguíneo y líquido sinovial.
- Tipo 1C. hialuronidasa submandibular, que está presente en la saliva animal y glándulas salivales.

La hialuronidasa testicular y lisosómica presentan actividad trans-glicosilasa y puede transferir fragmentos de disacáridos entre moléculas del sustrato (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 86-87).

1.6.1.2 Tipo 2

Esta hialuronidasa se halla en la saliva de las sanguijuelas. Los productos finales de la hidrólisis por hialuronidasas tipo 1 y tipo 2 son tetrasacáridos, que poseen un amino azúcar en su extremo reductor y se activan con las enzimas del tipo 1. Además, las hialuronidasas testiculares y lisosómicas son trans-glicosilasas y puede transferir fragmentos de disacáridos entre moléculas del sustrato. La hialuronidasa testicular es activada dentro del rango del pH 4.0-7.0, pero las hialuronidasa lisosomales y submandibulares solo son activas en el rango más estrecho de pH 3.5-4.5 (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 86-87).

1.6.1.3 Tipo 3

Hialuronidasas microbianas hidrolizan los enlaces β -N-acetilaminoglucósidos de un sustrato y simultáneamente deshidratan el residuo de ácido urónico en el extremo no reductor de la molécula. La especificidad del sustrato de las hialuronatoliasas bacterianas varía considerablemente en las diferentes especies de microbios productores. Por ejemplo la hialuronidasa de *Streptococcus pneumoniae* tiene la especificidad de sustrato más alta, solo hidroliza HA y no destruye otros glucosaminoglicanos (Mikhail, Boykov and Khabarov, 2015, pp. 86-87).

1.6.2 Estructura

En los venenos de serpientes las hialuronidasas endo- β -N-acetil-D-hexosaminidasas son de pH neutro. Poseen pesos moleculares que van desde 33 KDa a 110 KDa consta de heterogeneidad estructural debido a la modificación postraduccional o modificación defectuosa (Bala *et al.*, 2018, pp. 2408-2409).

Recientemente se ha descrito los ADNc que codifican las hialuronidasas del veneno de serpiente y la mayoría de los transcriptomas de las glándulas venenosas de serpiente contienen en la transcripción hialuronidasa y proteínas con una longitud de 440 y 450 aminoácidos (Bala *et al.*, 2018, pp. 2408-2409).

1.6.3 Actividad

Las hialuronidasas de acuerdo a la función de su perfil de actividad de pH se clasifican en ácido activo (pH 3-4), ejemplo de esto son las enzimas hepáticas y séricas humanas; y neutro activo

(pH 5-8), por ejemplo, enzima testicular ovina. Las hialuronidasas que son extraídas de las serpientes y otros venenos son proteínas con naturaleza glicoproteínas. La enzima que es extraída de los venenos de abeja, serpientes y escorpión se activa a pH 4-6 y poseen una masa molecular de 33-100kDa (Bala *et al.*, 2018, pp . 2408-2409).

El veneno de abeja y las hialuronidasas de mamíferos poseen un 30% de similitud en su secuencia, el motivo es el barril β/α triosa fosfato isomerasa (TIM), una estructura que posee siete cadenas de glicosil hidrolasas. Por otro lado, las hialuronidasas bacterianas contienen barriles α/α (Bala *et al.*, 2018, pp . 2408-2409).

Para medir la actividad de la hialuronidasa hay varios métodos. Algunos de los métodos se basan en la reducción de la viscosidad y la turbidez del medio. Otros métodos son la estimulación colorimétrica después de la formación del producto con p-dimetilbenzaldehído para reducir el terminal de β -N-acetil D-glucosamina/ β -N-acetil D hexosamina y ELISA (Bala *et al.*, 2018 , pp . 2408-2409).

1.6.4 Mecanismo

La enzima hialuronidasa destruye los enlaces glicosídicos internos de ciertos mucopolisacáridos ácidos del tejido conectivo, lo que produce una disminución de la viscosidad del tejido conectivo permitiendo que el veneno penetre en el interior de los tejidos. Por lo tanto, la hialuronidasa se designa como factor de diseminación (Bala *et al.*, 2018, p.6409).

En los últimos años, las hialuronidasas han recibido atención debido a la función reguladora que ejerce sobre el metabolismo del ácido hialurónico. Esta es una acción despolimerizante reversible y de corta duración que depende del pH y de la temperatura. Por lo tanto, bajo la acción de la degradación mediada por hialuronidasa del ácido hialurónico reduce la viscosidad, aumenta la permeabilidad de la membrana y proporciona tejidos altamente permeables a los fluidos inyectables (Bala *et al.*, 2018, p.6409).

Este proceso de degradación involucra la diseminación de toxinas, venenos, fertilizantes y progresión del cáncer y la patogénesis bacteriana. El diagrama de flujo del mecanismo catalítico de la hidrólisis de hialuronato por la enzima hialuronidasa del veneno de serpiente se ve en la siguiente figura:

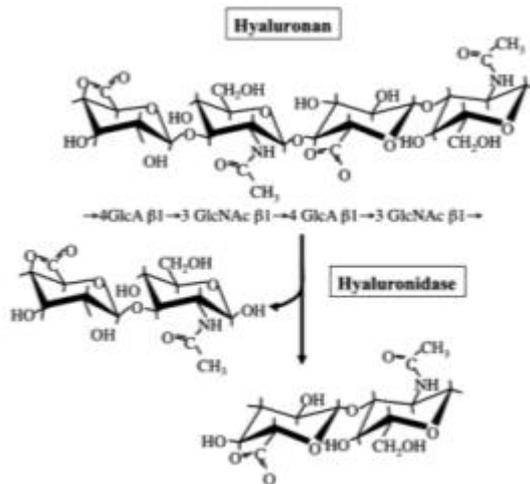


Figura 1-1 Mecanismo de acción de la enzima hialuronidasa
Fuente: Bala *et al.*, 2018

1.6.5 Compuestos inhibidores de la hialuronidasa

Son inhibidores de la hialuronidasa compuestos como flavonoides, alcaloides, antioxidantes, proteínas, glicosaminoglicanos, polisacáridos y compuestos antiinflamatorios los mismos que han sido investigados como constituyentes de plantas. Los extractos metanólicos o etanólicos de diferentes partes de diversas especies de plantas, se han indagado como inhibidores de hialuronidasa (Bala *et al.*, 2018, p. 6412).

Así mismo los inhibidores son agentes reguladores efectivos que están implicados en mantener el equilibrio entre catabolismo y el anabolismo del ácido hialurónico. En general, tienen diferentes formas químicas, así tenemos derivados bioactivos, proteínas, glicosaminoglicanos, polisacáridos y compuestos orgánicos sintéticos (Bala *et al.*, 2018, p.6412).

CAPITULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Zona de recolección de la especie vegetal

La especie vegetal *Piper peltatum* (santa María), se recolectó en Ecuador, provincia de Sucumbíos cantón Shushufindi, parroquia Shushufindi, Pre-cooperativa Nueva Quevedo, Recinto el “Mirador” km 5 vía Nueva Loja en la Finca del Sr. Gabriel Torres.

2.2 Lugar de estudio

El estudio se efectuó en el laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Bioquímica y farmacia, de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.3 Materiales y equipos

Tabla 2-2 Materiales usados en el análisis de calidad de materia prima

Análisis de calidad de materia Prima		
Materiales	Reactivos	Equipos
vasos de precipitación	Ácido clorhídrico	Sonicador
Pinzas para cápsulas		Estufa Memmer SNB 400
Cápsulas de porcelana		Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
Reverbero		Balanza Analítica
Piseta		Molino Arthur H. Thomas C.O
Embudo		
Trípode		
Papel filtro		

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Tabla 3-2 Materiales usados en el Tamizaje Fitoquímico

Tamizaje Fitoquímico		
Materiales	Reactivos	Equipos
Tubos de ensayo	Éter de petróleo	Balanza Analítica
Gradilla	Cloruro de Sodio	Sorbona

Embudo	Cloruro férrico	
Pipetas Volumétricas	Agua destilada	
Pinzas para tubos	Magnesio metálico	
Reverbero	Ácido clorhídrico	
	Alcohol amílico	
	Etanol	
	Reactivo de Mayer	
	Reactivo de Wagner	
	Reactivo de Sudan	
	Reactivo de Borntrager	
	Reactivo de catequinas	
	Reactivo de fehling	
	Reactivo de Lieberman Bouchard	
	Reactivo de Baljet	
	Reactivo para resinas	
	Reactivo Shinoda	

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Tabla 4-2 Materiales usados en el análisis de calidad del extracto

Análisis de calidad del extracto		
Materiales	Reactivos	Equipos
Picnómetro	Etanol	Balanza Analítica
Cápsulas de porcelana		Estufa Memmer SNB 400
Pinzas para cápsulas		Refractómetro
		pH-metro

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Tabla 5-2 Reactivos e implementos usados en la cuantificación de fenoles y flavonoides

Cuantificación de fenoles y flavonoides		
Materiales	Reactivos	Equipos
vasos de precipitación	Reactivo Folin-Ciocalteu 9%	Espectrofotómetro
Matraces de aforo de 100 ml	Reactivo de quercetina	Estufa
	Carbonato de sodio s	Balanza Analítica
	Hidróxido de sodio	Agitador magnético
	Nitrito de sodio	
	Solución de ácido gálico	
	Nitrito de sodio	

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Tabla 6-2 Reactivos e implementos usados en la prueba de inhibición de la hialuronidasa bovina

Inhibición de la hialuronidasa bovina		
Materiales	Reactivos	Equipos

Vasos de precipitación	P-dimetil benzaldehído	Incubadora
Matraces de aforo de 25 mL	Buffer acetato de sodio 0,1 M	Cronometro
Micropipetas	Hialuronidasa bovina	Espectrofotómetro
Tubos de ensayo	Hialuronato de sodio	Balanza Analítica
	Carbonato de calcio 12,5mM	pH-metro
	Hidróxido de sodio 0,4M	cronómetro
	Dimetil sulfóxido 5%	agitador magnético
	Ácido acético glacial	
	Ácido clorhídrico 10%	
	Agua bidestilada	

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Tabla 7-2 Reactivos e implementos usados en inhibición de la hialuronidasa en el veneno de serpiente

Inhibición de la hialuronidasa en el veneno de serpiente		
Materiales	Reactivos	Equipos
Micropipetas	Buffer acetato de sodio 0,1 M	Incubadora
Vasos de precipitación		Cronometro
Matraces de aforo 25 mL		Espectrofotómetro
		Balanza Analítica
		pH-metro

Realizado por: Ariel Torres, 2018

2.4 Técnicas y Métodos

2.4.1 Etapa de preparación de la materia prima

En este proceso se examinó cuidadosamente que las hojas estén libres de impurezas, a continuación se procedió a secarlas a una temperatura de 40°C. A continuación, las hojas fueron trituradas en el molino hasta reducir el tamaño de la partícula y se guardó en un sobre de papel.

2.4.2 Análisis del control de calidad de la materia prima

2.4.2.1 Control de humedad

Esta técnica se realizó colocando 2g de muestra en una cápsula de porcelana anticipadamente tarada, sometiendo por 3 horas a 105 °C para suprimir el agua presente en la muestra. Luego se ubicó en un desecador hasta enfriar y se pesó hasta obtener un peso constante (Miranda, 2006, p. 34).

Fórmula:

$$\%H = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

Dónde:

H= Porcentaje de pérdida de humedad

M2= peso de cápsula con la muestra.

M1= Peso de la cápsula con la muestra desecada

M= Masa de la cápsula tarada vacía.

2.4.2.2 *Determinación de cenizas totales*

Restante inorgánico del proceso de combustión de una muestra vegetal.

Procedimiento

Este procedimiento se desarrolló por peso, se tomó 2g de la muestra vegetal y se puso en un crisol previamente tarado, después se carbonizó la muestra hasta la eliminación total de la porción orgánica. Posteriormente, la muestra carbonizada se situó en una mufla a una temperatura de 700°C para su incineración, durante de 2 horas hasta la formación de una sustancia blanca. Después se enfrió la cápsula, se pesó hasta obtener un valor constante (Miranda, 2006, pp.31-32) .

Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(M2 - M1)}{(M1 - M)} \times 100$$

Dónde:

C= Porcentaje de cenizas

M2= peso del crisol y la ceniza.

M1= Peso del crisol y la muestra.

M= Peso del crisol vacío.

2.4.2.3 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Esta prueba consiste en establecer el total de materia inorgánica que está en las cenizas.

Procedimiento

Se añadió 15 mL de agua a las cenizas totales que estaban en el crisol, se tapó con vidrio reloj y se calentó en la llama del mechero por 5 minutos. Se filtró la solución con un papel especializado se colocó este papel en el crisol para luego carbonizar e incinerar en una mufla a una temperatura de 700°C por 2 horas. Finalmente, el crisol se enfrió en un desecador y se pesó hasta que tenga peso constante (Miranda, 2006, p.33).

Fórmula:

$$\%Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} \times 100$$

Dónde:

Ca= Porcentaje de cenizas solubles en agua

M2= Peso de la cápsula con las cenizas totales

M1= Peso de la cápsula con la cenizas insolubles

M= Peso de la cápsula vacía

2.4.2.4 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Mediante este método se obtiene la cantidad de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico.

Procedimiento:

Al producto obtenido en la prueba anterior se le añadió 3 mL de ácido clorhídrico al 10% y se sometió al calor tapado con vidrio reloj a baño maría durante 10 minutos, después se lavó el vidrio reloj vertiendo el contenido en el crisol. Filtrar la solución con un papel filtro, la sustancia residual se lava con agua caliente por algunas ocasiones hasta no haya presencia de cloruros.

El producto del filtrado se secó en una estufa a una temperatura de 105 °C, posteriormente se coloca en un crisol y se incinera en una mufla por dos horas a 700 °C. Finalmente, el crisol se dejó enfriar en el desecador y se pesa hasta que tenga un peso constante (Miranda, 2006, pp. 33-34).

Fórmula:

$$\%B = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Dónde:

B= Porcentaje de cenizas solubles en ácido clorhídrico.

M1= Peso de la cápsula de porcelana con la muestra

M= Peso de la cápsula de porcelana vacía.

M2= Peso de la cápsula con las cenizas solubles en ácido clorhídrico.

2.4.3 Tamizaje Fitoquímico

Estos ensayos se realizan de manera cualitativa a los grupos fitoquímicos que posee la especie vegetal mediante reacciones de coloración.

Procedimiento:

Las hojas de la planta son sometidas a solventes de diferente polaridad para lograr la separación de los metabolitos.



Figura 2-2 Cuadro de preparación de los extractos para la obtención de compuestos fitoquímicos.
Fuente:(Miranda, 2006, pp. 40-45)

Una vez preparados los extractos se efectuó las distintas reacciones que permiten establecer la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios. En la figura 2-2, figura 3-2 y en la figura 4-2 se observa el esquema de los diferentes ensayos para ejecutar el tamizaje fitoquímico (Miranda, 2006, pp.40-45).



Figura 3-2 Diagrama de ensayos del extracto acuoso

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40-45)



Figura 4-2 Diagrama de los ensayos del extracto alcohólico

Fuente:(Miranda, 2006, pp. 40-45)

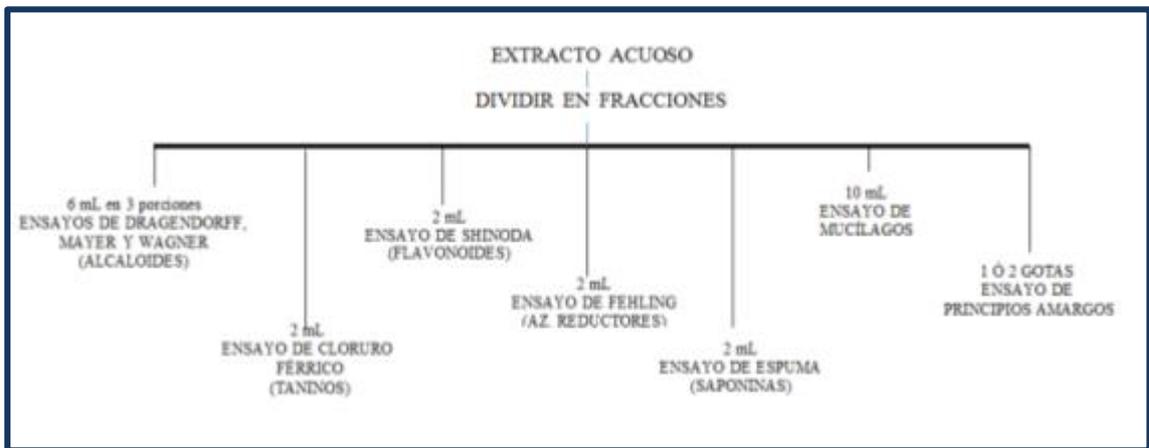


Figura 5-2 Diagrama de los ensayos del extracto acuoso

Fuente:(Miranda, 2006, pp. 40-45)

2.4.3.1 *Ensayo de Sudan*

Este ensayo se usa para determinar la existencia de compuestos grasos en la muestra. Para lo cual se toma 5 mL del extracto y se agrega 1 mL de reactivo sudan. Se calienta a baño maría hasta que los solventes se evaporen. Para reportar el resultado se observa si aparecen gotas rojas en las paredes del tubo de ensayo (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.2 *Ensayo de Dragendorff*

Este ensayo se realiza para determinar la existencia de alcaloides, se toma 5 mL del extracto, se calienta hasta que se evapore el solvente, a su vez el residuo es redissuelto en 1 mL de ácido clorhídrico al 1%.

Para el extracto acuoso, se agregó una gota de ácido clorhídrico concentrado se somete a calor y se deja enfriar. Además, se le agrega 3 gotas del reactivo de Dragendorff a la solución acuosa ácida. Se observa y se considera los siguientes parámetros, cuando es positivo hay señal de opalescencia (+), turbidez (++) y precipitación (+++) (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.3 *Ensayo de Mayer*

Este método se realiza para determinar la existencia de alcaloides en la muestra, con este propósito se realizan los pasos del ensayo anterior hasta conseguir una solución ácida. Después se agrega una pequeña cantidad de partículas de cloruro de sodio, agitar y filtrar; posteriormente se colocan 3 gotas de reactivo Mayer. Se observa y se considera los siguientes parámetros para reportar primero si hay señal de opalescencia (+), turbidez (++) y precipitación (+++) (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.4 *Ensayo de Wagner*

Al igual que el método anterior se determina la presencia de alcaloides aplicando el mismo procedimiento. Para el reporte de los resultados se observa la opalescencia (+), turbidez (++) y precipitación (+++)(Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.5 *Ensayo de Baljet*

A través de este método se determina la existencia de compuestos cumarínicos del grupo lactónico. Cuando el extracto no es alcohólico, se calienta hasta evaporar y se redisuelve en 1 mL de alcohol, a continuación, se agrega 1 mL de reactivo. Se reporta positivo si surge coloración roja (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.6 *Ensayo de Borntrager*

Con este método se determina la existencia de quinonas en el extracto. Se efectuó agregando una pequeña cantidad de extracto, se calienta a baño maría y la parte sobrante se disuelve en 1 mL de cloroformo; añadir 1mL de hidróxido de sodio al 5% y mezclar, se deja reposar hasta la disociación de las fases. Se reporta como positivo cuando la fase acuosa se torna de color rosado (++) o rojo (+++) (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.7 *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Este método es usado para ver si existe compuestos triterpenos y esteroides, debido a que tienen núcleo de androstano que posee insaturaciones en el anillo B y la posición 5 y 6. Para efectuar este ensayo una alícuota del extracto se calienta a baño maría hasta que se evapore el solvente, el producto residual se disuelve en 1mL de cloroformo; posteriormente se agregan 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo de ensayo. Si es positivo se observa:

- Rosado-Azul rápido.
- Verde intenso-visible, aunque rápido.
- Verde Oscuro- negro –final de la reacción (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.8 *Ensayo de Catequinas*

Para efectuar este método se extrae con un capilar una pequeña cantidad de extracto alcohólico y se aplica en un papel filtro; a la vez se añade una gota de carbonato de sodio. El método se reporta como positivo si se forma una mancha verde carmelita al observarse en una cámara UV (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.9 *Ensayo de resinas*

Para realizar este método poner 2 mL de extracto alcohólico y se añade 10 mL de agua destilada. Se considera positivo si se observa un precipitado (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.10 *Ensayo de Fehling*

Este método se emplea para determinar si hay azúcares reductores. Para lo cual se calentó la muestra hasta que se evaporó el solvente, por otro lado, si el extracto no está en agua se re disuelve en 2mL de agua. Añadir 2mL de reactivo y calentar a baño maría por 10 minutos. Se reporta positivo si se torna rojo ladrillo el tubo o un precipitado rojo (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.11 *Ensayo de espuma*

Mediante esta técnica se determina si existe la presencia de saponinas. Para esto se toman 2 mL de extracto agregando 5 veces más de agua, agitar por un periodo de 10 minutos. Se reporta

positivo si se forma espuma en la parte superior del tubo de ensayo y esta permanece por 2 minutos (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.12 *Ensayo de cloruro férrico*

Este método se realiza para determinar si existe compuestos fenólicos. El procedimiento se desarrolla colocando 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en 2 mL de extracto alcohólico. Si el extracto es acuoso se pueden detectar taninos, para lo cual en 2mL de extracto se agregó acetato de sodio y 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Para reportar se debe observar las coloraciones que se forman, así tenemos:

- Formación de color rojo-vino, indica presencia de fenoles.
- Formación de color verde intenso, presencia de taninos pirocatecólicos.
- Formación de color azul, presencia de taninos pirogalotánicos (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.13 *Ensayo de Shinoda*

Este método se realiza disolviendo 2 mL de extracto alcohólico o acuoso en 1mL de ácido clorhídrico y a su vez agregando magnesio metálico. Terminada la reacción en un tiempo 5 minutos se añade alcohol amílico se agita y se espera hasta la separación de las fases. Se reporta positivo cuando el alcohol amílico se torna de los colores amarillo, naranja, carmelita o rojo (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.14 *Ensayo de antocianidinas*

Esta técnica es usada para determinar la existencia de flavonoides con cadena $C_6-C_3-C_6$. Con este propósito se somete a calor 2 mL de extracto alcohólico y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado durante 10 minutos y enfriar. Posteriormente se agregó 1mL de agua con 2 mL de alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta que se dividan en dos fases. El resultado es positivo si se forma de color rojo o marrón ladrillo en la fase amilica (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.15 *Ensayo de mucílagos*

Mediante el uso de esta técnica se determina la presencia de compuestos polisacáridos que constituyen un coloide hidrófilo con la capacidad de aumentar la densidad del agua. Para el

desarrollo de este método se enfrió 10 mL de extracto acuoso a una temperatura de 0-5°C, el resultado es positivo cuando la sustancia aumenta su viscosidad y es gelatinosa (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.3.16 Ensayo de principios amargos y astringentes

Este procedimiento se efectuó analizando 1 gota de extracto acuoso oralmente con las papilas gustativas identificando su sabor (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.4 Realización del extracto hidroalcohólico de Piper peltatum

Se pesó 20g de las hojas de la planta molida y se añadió 100 mL de etanol al 50% en un frasco ámbar durante dos días. Posteriormente se colocó el extracto en el sonicador por media hora, se filtró y colocó en el rota vapor hasta concentrar, luego se almacenó a baja temperatura (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.5 Análisis de calidad del extracto hidroalcohólico.

2.4.5.1 Requerimientos organolépticos

- Prueba del olor: Para esta prueba se usó un pedazo de papel de 1cm de ancho por 10cm de largo y se introduce en la muestra y con el sentido del olfato se identifica el olor del extracto.
- Prueba de color: Se colocó extracto en un tubo de ensayo hasta las tres cuartas partes y observar el color y las características visuales que este posee (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.5.2 Análisis de densidad relativa

La densidad relativa es la correlación que hay entre la masa del volumen del extracto y la masa de un volumen con agua, esto se realiza en las mismas condiciones ambientales.

Procedimiento:

Se pesó el picnómetro vacío y seco a una temperatura ambiente de 25°C, después se agregó el extracto hasta llenar a la misma temperatura por un periodo de 15 minutos y se pesó.

Posteriormente al picnómetro se lo lleno con agua destilada a la misma temperatura (Miranda, 2006, pp. 40-45).

Fórmula:

$$D = \frac{(M1 - M)}{(M2 - M)}$$

Dónde:

M1: Es la masa en gramos del picnómetro con el extracto

M2: Es la masa en gramos del picnómetro con el agua destilada

M: Es la masa en gramos del picnómetro vacío

2.4.5.3 *Índice de refracción*

Es el valor dado con el cual se manifiesta la relación entre el seno ángulo de incidencia de la luz con el de refracción.

Desarrollo:

Se agregó una gota de agua destilada en el prisma del equipo para ajustar la zona de medición. Después poner una gota del extracto en el mismo lugar para su medición, se repliega el termoprisma y se orienta la luz de forma que este alcance la zona de entrada del prisma de medición (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.5.4 *Medición del pH*

Es el valor numérico que indica el potencial hidrogeno presente en el extracto

Desarrollo

Este método se efectuó mediante el uso de un pH metro digital, con este propósito se calibro primeramente el equipo, después se midió el pH del extracto (Miranda, 2006, pp. 40-45).

2.4.5.5 *Análisis de sólidos totales*

Se analiza el cambio en la masa al eliminarse los componentes volátiles por el proceso de calentamiento hasta su ebullición (Miranda, 2006, pp. 40-45).

Desarrollo

Primeramente para realizar este ensayo se tomó 5 mL del extracto en una cápsula que posea peso constante, y someter a calor por baño maría hasta que se evaporaron las sustancias líquidas. Posteriormente, ubicar la cápsula en la estufa a una temperatura de 105°C por tres horas, transcurrido este tiempo se dejó enfriar la cápsula en el desecador y se pesó hasta que tenga peso constante (Miranda, 2006, pp. 40-45).

Fórmula:

$$ST = \frac{(Pr - P)}{V} \times 100$$

Dónde:

Pr= Es el peso de la cápsula de porcelana más el remanente del extracto

P= Peso de la cápsula de porcelana vacía.

V= Volumen de la fracción del extracto.

2.4.6 *Método Folin-Ciocalteu para cuantificar compuestos fenólicos*

El Folin Ciocalteu es muy usado en la cuantificación de compuestos fenólicos totales en diversos extractos. Así mismo es un método colorimétrico que permite analizar compuestos orgánicos que tienen anillos aromáticos hidroxilados. Los compuestos fenólicos reaccionan al reactivo (fosfomolibdato y fosfotungstato), produciendo una coloración azul que se puede leer en el espectrofotómetro (Velázquez *et al.*, 2015, p. 481).

Se usa el ácido gálico como referencia realizando una curva de calibración a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm (mg/L).

Desarrollo: Primeramente, se colocaba una muestra de 250µL y se diluyó en 15 mL de agua destilada. Más tarde se agrega 1,25 mL de reactivo Folin- Ciocalteu. A continuación se agitó en un equipo vórtex y colocar en la oscuridad durante un tiempo de 8 minutos y se añade 3,75 mL de carbonato de sodio al 7,5%. Finalmente se aforó la solución a 25 mL, luego se mezcló y se ubicó en un lugar oscuro por 2 horas. La lectura se realizó a 765 nm. (Rover and Brown, 2013, p. 2).

2.4.7 Cuantificación de flavonoides.

Para la cuantificación de flavonoides se utiliza como referencia la quercetina elaborando una curva de calibración a concentraciones de 20; 40; 60; 80; y 100 mg/L.

Primeramente colocaba 1mL de muestra en un tubo de ensayo y agregaba 4mL de agua destilada, posteriormente se añadió 300 µL de solución de nitrito de sodio al 5% y se mezcló y ubicado en un lugar oscuro durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 300 µL de tricloruro de aluminio al 10% se mezcla y se pone de nuevo en la oscuridad por 5 minutos. Después se adiciono 2mL de hidróxido de sodio 1M se agito y coloco la muestra en un lugar cerrado libre de luz por 15 minutos. La lectura se realizó de la medición a 510 nm (Raj *et al.*, 2010, p.432) .

2.4.8 Evaluación de la actividad inhibitoria

2.4.8.1 Inhibición de la hialuronidasa bovina

- Inicialmente se colocó 50 µL de enzima hialuronidasa bovina a 7900 unidades/ mL en un tubo de ensayo y mezclar con solución tampón de acetato de sodio 0,1M (pH 3,6).
- Posteriormente se agrega 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% a distintas concentraciones del extracto liofilizado.
- En el grupo control se añadió únicamente 50 µL de DMSO al 5%. Posteriormente se incubaba en baño de agua a 37°C durante 20 minutos.
- Luego para activar la enzima se adiciono 50 µL de cloruro de calcio a una concentración de 12,5 mmol/L y se vuelve a incubarse en baño de agua por 20 minutos a 37°C.
- El comienzo de la reacción empezó con la adición de 250 µL de hialuronato de sodio (1,2mg/mL) y poner a incubarse en baño de agua por el tiempo de 40 minutos a 37°C.
- Transcurrido la fase de incubación se mezcló con 50 µL de Hidróxido de sodio 0,4M y 100 µL de borato de potasio 0,2M. A continuación, se calienta a baño de agua hirviendo durante 3 minutos y se enfría.
- Luego se añadía 1,5 mL de p-dimetilbenzaldehído e incubaba en baño de agua a 37°C por un periodo de 20 minutos y leer en el espectrofotómetro a 585nm (Ratnasooriya, Abeysekera and Ratnasooriya, 2014, p. 960) (Liyanaarachchi *et al.*, 2018, p.599)(Süntar *et al.*, 2012, p.538).

Fòrmula:

$$\%Inhibición = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100$$

Donde:

Ac= absorvacia control

As= absorvacia de la muestra

Tabla 8-2 Elaboración del proceso de inhibición de la hialuronidasa bovina a diferentes concentraciones de la especie *Piper Peltatum*

INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA									
SUSTANCIAS REACTANTES	BLANCO	CONTROL DE ACTIVIDAD	C: DE 1000	C: DE 250	C: DE 100	C: DE 50	C: DE 25	C: DE 12,5	C: DE 6,25
SOLUCIÓN TAMPÓN pH 3,6	50µL								
Hialuronidasa Bovina		50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
DMSO 5%		50µL							
Concentración vegetal más DMSO 5%	50µL		50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
Incubar a 37°C por 20 min									
CaCl2 12,5mMol	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
Incubar a 37°C por 20 min									
Hialuronato de Sodio		250µL	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL
Incubar a 37°C por 40 min									
NaOH 0,4M	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
Borato de Sodio 0,2M	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL	100µL
Colocar en baño de agua hirviendo por 3 min									
Enfriar									

P-dimetilbenzaldehido	1,5mL								
Incubar a 37°C por 20 min									
Analizar a 585 nm									

Realizado por: Ariel Torres, 2018

2.4.8.2 Inhibición de hialuronidasa en el veneno de serpiente

- Para efectuar esta técnica se diluyó 100 µg de veneno de serpiente en 20 µL de solución salina y agregar 50 µg de ácido hialurónico disuelto en 250 µL de solución tampón de acetato 0,2M (pH 5.0) que contiene cloruro de sodio 0,15M.
- Una vez añadidas las soluciones con la muestra vegetal y se procedió de manera similar al método anterior e incubar.
- Realizar la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 585 nm (Süntar *et al.*, 2012, p. 538).

Tabla 9-2 Elaboración del proceso de inhibición de la hialuronidasa en el veneno de serpiente a diferentes concentraciones de la especie *Piper peltatum*

INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA DEL VENENO DE SERPIENTE								
SUSTANCIAS REACTANTES	BLANCO	CONTROL DE ACTIVIDAD	C: DE 1000	C: DE 250	C: DE 50	C: DE 25	C: DE 12,5	C: DE 6,25
SOLUCIÓN TAMPÓN pH 5	250µL							
Veneno de serpiente + solución salina		20µL	20µL	20µL	20µL	20µL	20µL	20µL
Ácido hialurónico + buffer acetato 0,2M con NaCl 0,15M		250µL	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL	250µL
DMSO 5%	50µL							
Concentración vegetal más DMSO 5%			50µL	50µL	50µL	50µL	50µL	50µL
Incubar a 37°C								
Analizar a 585 nm								

Realizado por: Ariel Torres, 2018

CAPITULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Análisis de atributos de calidad del extracto de la especie vegetal

En la tabla 1-3 se puede apreciar los resultados del control de calidad de las hojas de la especie vegetal *Piper Peltatum*.

Tabla 10-2 Resultados del análisis de calidad del extracto de la muestra vegetal

Parámetro	Resultados (%)
Cenizas Totales	9,25±0,01
Cenizas solubles en agua	4,44±0,03
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	3,72± 0,05
Humedad	6,66±0,02

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Se evaluó los parámetros de calidad del extracto de las hojas de *Piper peltatum*, por lo que se determinó que el contenido de cenizas totales fue de 9,25% valor considerado normal respecto a lo señalado en la USP #35 de 12%.

La cantidad de cenizas solubles en agua fue de 4,44% comparado con el valor estándar de la USP# 35 que es $\leq 12\%$ siendo considerado un parámetro normal. Así mismo, el porcentaje de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico fue de 3,72% que cumple según lo indicado por la USP en donde señala que el valor debe ser $\leq 5\%$ demostrando que el contenido de material inorgánico de la muestra es el adecuado.

Comparativamente el valor de 6,66% de la humedad demuestra que el contenido es el adecuado (valor de referencia hasta 14%) y que el proceso de recolección y procesamiento de la materia prima fue realizado de la mejor manera. Siendo además un indicativo de menor propagación de microorganismos y una buena conservación de la muestra.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

Con la finalidad de representar los datos obtenidos en el tamizaje se elaboró la tabla 11-3

Tabla 11-3 Resultados de la realización del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Piper peltatum*

Ensayo	Compuesto a determinar	Extracto acuoso	Extracto alcohólico	Extracto Etéreo
Sudan	Compuestos grasos	NA	NA	+
Dragendorff	Alcaloides	+++	+	+
Mayer	Alcaloides	++	++	-
Wagner	Alcaloides	++	+	-
Baljet	Cumarinas	NA	++	+
Lieberman-Burchard	Terpenos	NA	+++	+++
Fehling	Azúcares	+	+	NA
Espuma	Saponinas	+	-	NA
Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos	-	+	NA
Borntrager	Quinonas	NA	+	NA
Catequinas	Catequinas	NA	-	NA
Shinoda	Flavonoides	+	-	NA
Antocianidina	Antocianidina	NA	-	NA
Resinas	Resinas	NA	-	NA
Mucílago	Polisacáridos	-	NA	NA
Principio Amargos	Principios amargos y astringentes	-	NA	NA

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Dónde: (+) Presencia escasa, (++) Moderada, (+++) los compuestos son abundantes

El análisis fitoquímico permitió identificar los compuestos que están presentes en las hojas de *Piper peltatum*, encontrándose principalmente alcaloides en los extractos acuoso y alcohólico. También, en el extracto alcohólico resultó positivo para azúcares reductores, terpenos, quinonas, fenoles y cumarinas.

En el extracto acuoso se presentaron flavonoides, saponinas y azúcares reductores. Mientras que en el extracto etéreo hay compuestos grasos y terpenos. Siendo los flavonoides y alcaloides los compuestos con mayor número de investigaciones respecto a su actividad biológica.

3.3 Control de calidad del extracto alcohólico

En la tabla 12-3 se encuentran los resultados obtenidos del control de calidad del extracto hidroalcohólico.

Tabla 12-3 Resultados del control de calidad del extracto de hojas de *Piper peltatum*

Parámetros	Resultados
Densidad Relativa	0,9047 g/mL
Índice de refracción	1,36
pH	6,26
Sólidos Totales	1,59%
Cualidades Organolépticas	Olor: dulce agradable
	Sabor : Insípido
	Color: verde oscuro
	Consistencia: líquida

Realizado por: Ariel Torres, 2018

La densidad relativa del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* de 0,9047g/mL, acompañado del índice de refracción de 1,36 y el de los sólidos totales 1,59% indican la presencia de sustancias disueltas en el extracto.

El pH de 6,26 demuestra que el extracto es de característica ácida coincidiendo con la presencia de metabolitos secundarios ácidos (Pacheco *et al.*, 2013, pp.56-57).

En la evaluación sensorial se determinó que el olor es dulce, su sabor insípido y con color verde oscuro, lo cual se debe a la presencia de los metabolitos extraídos con el solvente (Pérez-portero, Rodríguez-leblanch and Aguilar-navarro, 2016, p.446).

3.4 Cuantificación de fenoles en el extracto por el método de Folin-Ciocalteu

Los fenoles son metabolitos secundarios producidos entre otras funciones como mecanismo de defensa de la planta y a nivel biológico presenta actividad terapéutica como efectos anticancerígenos, anti mutagénicos y antioxidantes. Se realizó el análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 765 nm consiguiendo los datos necesarios para elaborar la curva de calibración y calcular la concentración de fenoles.

Tabla 13-3 Resultados de la cuantificación de fenoles en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper peltatum*

FENOLES TOTALES	
mg equivalente de ácido galico/g extracto seco	G Equivalentes de ácido galico/100g de extracto seco (%EQFT)
14,49±1,2	1,449±0,012

Realizado por: Ariel Torres, 2018

En la tabla 13-3 se puede observar que el contenido de fenoles totales presentes en las hojas de *Piper peltatum* es de 14,49± 1,2 mg GAE/g de extracto de planta. Al realizar una lectura de las absorbancias del extracto hidroalcohólico de *Piper peltatum* se encontró que a mayor concentración mayor coloración.

En la Investigación de Puertas (2009) se determinó que el extracto hexánico de esta especie hay 8,6 ± 0,9 mEq de ácido gálico (mEqAG) por cada 100g de planta seca (Puertas-Mejía I *et al.*, 2009, p.5). Por lo que el valor podría ser significativamente menor respecto a la investigación de Puertas debido a las condiciones ambientales en donde fue recolectada la planta, el estado de crecimiento de la especie y sobre todo a que el extracto analizado en la presente tesis fue a partir del extracto hidroalcohólico etc.

3.5 Cuantificación de flavonoides Totales en el extracto

Tabla 14-3 Resultados de la cuantificación de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper peltatum*

Flavonoides Totales	
mg equivalente de Quercetina/g extracto seco	G Equivalentes de Quercetina/100g de extracto seco (%EQFT)
14,53±0,208	1,453 ± 0,002

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Se analizó el contenido total de flavonoides a una longitud de onda de 510 nm obteniéndose las absorbancias necesarias para realizar la curva de calibración y calcular su concentración.

En la tabla 14-3 se establece que el contenido total de flavonoides es de 14,53 ±0,208 mg de Quercetina/g extracto de planta de hojas secas. En investigaciones previas, se cuantificó por el

método de Kostennikova dando un resultado de $1,8 \pm 0,16$ por mg de Quercetina/g por cada 100g de hoja seca (Soto Vásquez, 2015, p.105). Al compararlos se puede decir que dichos valores se asemejan.

3.5.1 Inhibición de hialuronidasa bovina

La inhibición de la hialuronidasa se realizó aplicando concentraciones sucesivas del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper peltatum*.

Tabla 15-3 Resultados de la inhibición de la hialuronidasa bovina a diferentes concentraciones de *Piper peltatum*

Inhibición de la hialuronidasa bovina	
Concentraciones	porcentajes
1000	69,7468354
250	81,1392405
100	80,5063291
50	79,6202532
25	77,721519
12,5	74,0506329
6,25	72,7848101

Realizado por: Ariel Torres, 2018

De la tabla 15-3 se observa que a mayor concentración del extracto se presenta menor actividad inhibitoria, mientras que a medida que la concentración disminuye aumenta la actividad. La concentración con mayor actividad inhibitoria fue la de 250 ppm con un porcentaje de inhibición de 81,13%, posteriormente a esta concentración su actividad disminuye ligeramente hasta llegar a los 1000 ppm donde se reportó una actividad del 69,74%.

Al comparar con otros estudios de especies vegetales del Ecuador, se puede apreciar que la tendencia es la misma, que a mayores concentraciones la actividad disminuye mientras concentraciones bajas la actividad aumenta. Esto se debe posiblemente a que a los compuestos tienden a saturar los sitios activos de acción enzimática, lo que dificulta la inhibición de la enzima, por otra parte a concentraciones pequeñas los compuestos pueden actuar libremente e inhiben mejor la hialuronidasa bovina (Sánchez, 2015, pp.45).

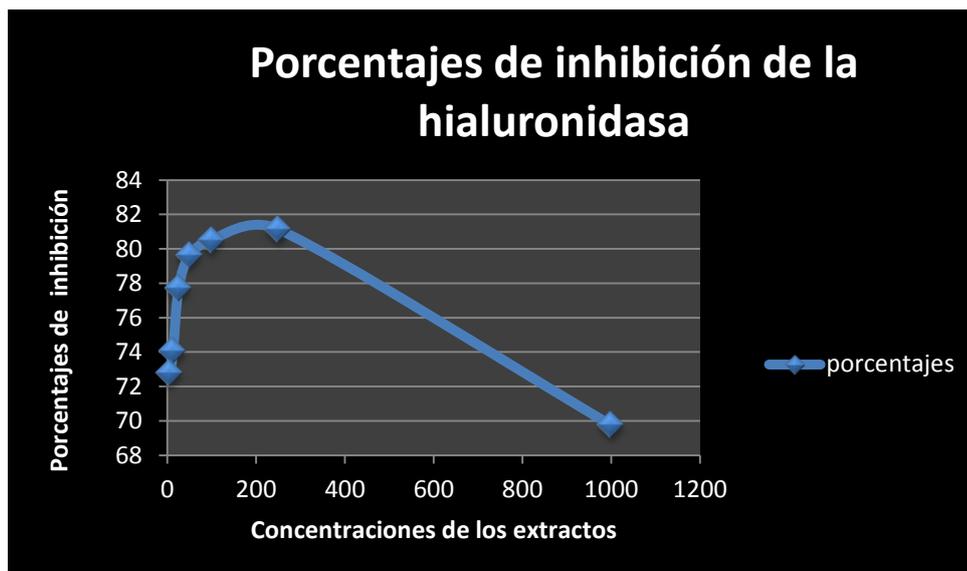


Gráfico 1-3 Curva de los porcentajes de inhibición de la hialuronidasa bovina a diferentes concentraciones de *Piper Peltatum*

Realizado por: Ariel Torres, 2018

En la gráfica se puede apreciar la actividad inhibitoria de la hialuronidasa bovina a diferentes concentraciones. El 4-nerolidilcatecol es el compuesto que tienen mayor presencia en esta especie, y posiblemente sea el compuesto responsable del efecto inhibitorio.

3.6 Análisis de resultados de la inhibición de la hialuronidasa en los venenos de serpiente

Tabla 16-3 Porcentajes de inhibición de la hialuronidasa en los venenos de serpiente *Bothrops Atrox* y *Naja Atra*

Concentraciones	<i>Bothrops atrox</i>	<i>Naja Atra</i>
1000	4,69	14,59
250	17,18	30,12
50	23,53	35,05
25	23,80	37,12
12,5	24,07	37,92
6,25	23,05	40,17

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Al analizar la tabla 16-3 se observa que los porcentajes de inhibición de la hialuronidasa del veneno de serpiente *Naja Atra* son mayores que los valores de la inhibición de la hialuronidasa en el veneno de serpiente *Bothrops atrox*. Una vez que el ácido hialurónico entra en contacto con la hialuronidasa desencadena una reacción en la que se produce N-acetilglucosamina y turbidez.

La diferencia en el porcentaje de inhibición se debe posiblemente a la variabilidad genética de las serpientes que incide en la cantidad de hialuronidasa presente en los venenos.

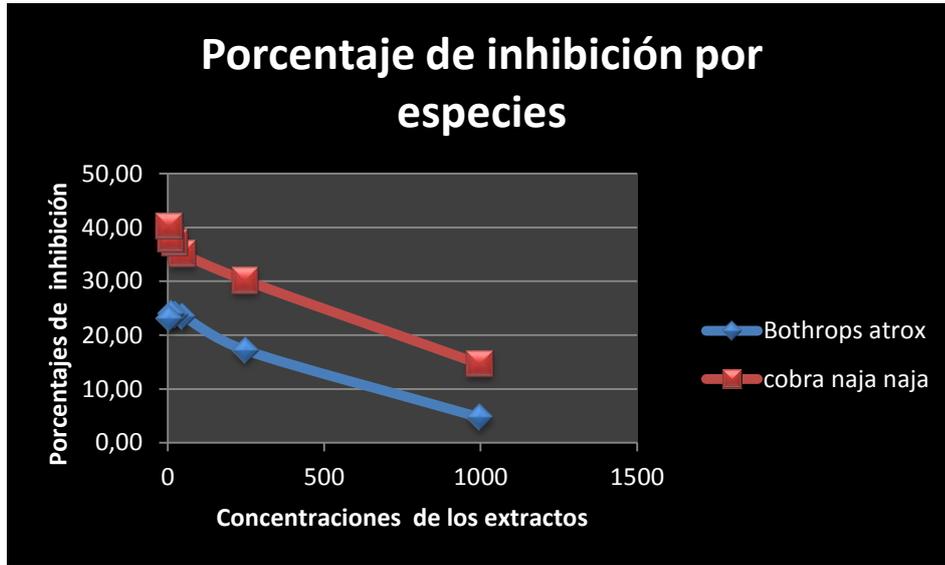


Gráfico 2-3 Curvas de los porcentajes de inhibición de la hialuronidasa de los venenos de serpiente *Naja Naja* *Atra* y *Bothrops atrox*.

Realizado por: Ariel Torres, 2018

En la figura 7-3, se puede apreciar la inhibición de la hialuronidasa en los venenos de serpiente siendo mayor la inhibición a más bajas concentraciones. En el veneno de cobra la mejor inhibición se presentó a la concentración de 6,25 ppm con un porcentaje de 40,17%. Mientras que a la concentración de 1000 ppm el porcentaje fue únicamente de 14,59%. Mientras, que en el veneno de *Bothrops atrox* la concentración de 12,5 ppm dio un mayor porcentaje de inhibición con 24.07%.

Al parecer a más bajas concentraciones los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico desempeñan una mejor función debido a que hay menos compuestos que obstruyan su movilidad.

Tabla 17-3 Absorbancias de la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra

Absorbancias de la inhibición del veneno de cobra							
tiempo	Concentraciones						
	control	1000	250	50	25	12,5	6,25
0	0,026	0,025	0,02	0,019	0,019	0,019	0,019
30	0,027	0,025	0,021	0,02	0,019	0,019	0,019

60	0,028	0,025	0,021	0,02	0,019	0,019	0,019
90	0,03	0,025	0,022	0,02	0,019	0,02	0,019
120	0,032	0,025	0,021	0,02	0,02	0,02	0,018
150	0,033	0,026	0,021	0,02	0,02	0,02	0,018
180	0,033	0,027	0,021	0,021	0,02	0,02	0,018
210	0,033	0,028	0,021	0,02	0,02	0,019	0,018
240	0,033	0,028	0,023	0,02	0,019	0,018	0,018
270	0,033	0,028	0,023	0,02	0,019	0,018	0,018
300	0,033	0,028	0,023	0,02	0,019	0,018	0,018

Realizado por: Ariel Torres, 2018

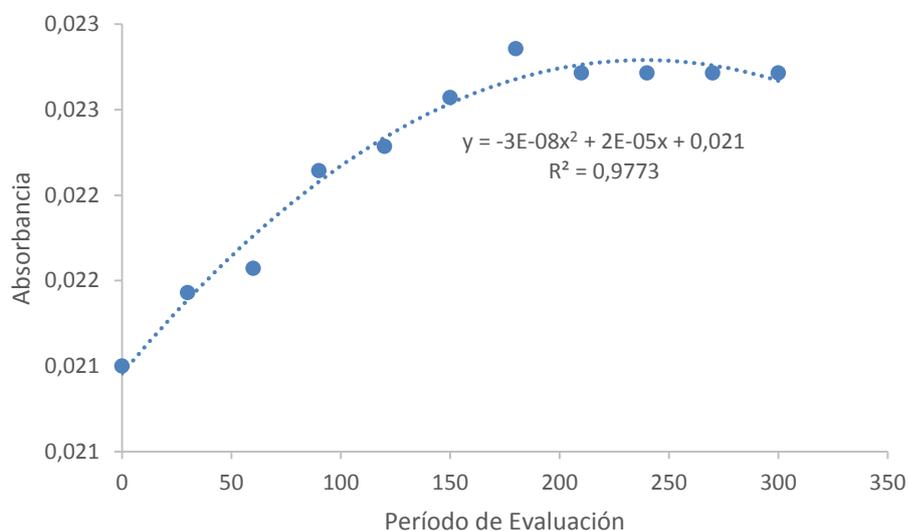


Gráfico 3-3 Regresión cuadrática de segundo orden de las absorbancias de la inhibición de la hialuronidasa de *Naja naja atra*

Realizado por: Ariel Torres, 2018

La absorbancia de la hialuronidasa del veneno de cobra en el espectrofotómetro está asociada significativamente ($P < 0.01$) al tiempo de evaluación, por lo que el 97,73 % de absorbancia está determinado por el tiempo siendo una regresión de segundo orden, en donde por cada segundo

que transcurre hasta los 200s, el incremento de la absorbancia es de 2E-05 y a partir de este periodo la absorbancia empieza a reducirse en 3E-08, esto posiblemente se deba a una terminación del sustrato de la enzima.

Tabla 18-3 Absorbancias de las inhibiciones de la hialuronidasa del veneno de *Bohtrops atrox* a diferentes concentraciones

Absorbancias con el veneno de <i>Bothrops atrox</i>							
tiempo	Concentraciones						
	control	1000	250	50	25	12,5	6,25
0	0,028	0,028	0,025	0,023	0,023	0,023	0,023
30	0,029	0,028	0,026	0,024	0,024	0,024	0,023
60	0,03	0,028	0,026	0,024	0,024	0,024	0,023
90	0,03	0,031	0,026	0,024	0,024	0,024	0,024
120	0,03	0,031	0,026	0,024	0,024	0,024	0,024
150	0,031	0,031	0,026	0,024	0,024	0,024	0,025
180	0,034	0,031	0,026	0,024	0,025	0,024	0,025
210	0,034	0,031	0,026	0,024	0,024	0,024	0,025
240	0,034	0,031	0,026	0,024	0,024	0,024	0,025
270	0,034	0,032	0,027	0,024	0,024	0,024	0,025
300	0,034	0,032	0,027	0,026	0,024	0,024	0,025

Realizado por: Ariel Torres, 2018

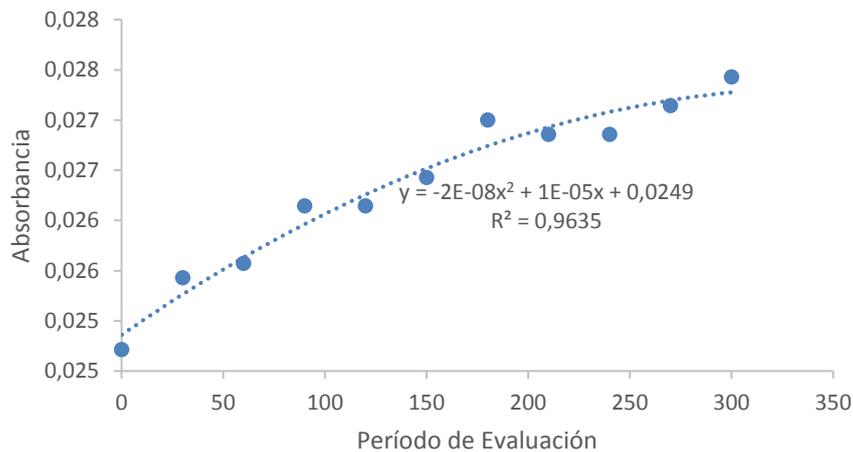


Gráfico 4-3 Regresión cuadrática de segundo de orden del veneno de las absorbancias de la hialuronidasa de *Bothrops atrox*

Realizado por: Ariel Torres, 2018

La absorbancia de la hialuronidasa del veneno de *Bothrops atrox* en el espectrofotómetro está asociada significativamente ($P < 0.01$) al tiempo de evaluación, el 96,35 % de absorbancia está determinado por el tiempo a una regresión de segundo orden, en donde por cada segundo que

transcurre hasta los 180s, el incremento de la absorbancia es de 1E-05 y a partir de este periodo la absorbancia empieza a reducirse en 2E-08.

De lo anteriormente mencionado, se puede decir que, a menor concentración de extracto hidroalcohólico, se libera menor cantidad de N-acetilglucosamina produciendo mayor porcentaje de inhibición. También a un tiempo de 180s, el sustrato se termina y por ende la reacción enzimática se estabiliza (Sánchez, 2015, p.50).

3.7 Análisis estadístico

Tabla 19-3 Análisis estadístico test de Fisher

F. Var.	Gl	S. Cuad.	C. Medio	Fisher	P. Fisher
Total	153	0,0030			
P. evaluac.	10	0,0001	0,0000	6,56	3,6E-08
Reptiles	1	0,0006	0,0006	569,55	2,4E-49
Concentración	6	0,0021	0,0003	306,84	3,4E-74
Inter. AB	6	0,0001	0,0000	13,19	1,3E-11
Error	130	0,0001	0,0000		
CV %			4,3784		
Media			0,0243		

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Los datos obtenidos se analizaron aplicando diferentes pruebas y tests estadísticos, para evaluar si existe o no diferencias significativas entre los diferentes extractos.

Se inició con el test de Fisher, el cual indicó que se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto los extractos hidroalcohólicos de *Piper peltatum* inhiben la hialuronidasa debido a que la probabilidad de Fisher es menor a 0,05.

Tabla 20-3 Evaluación de diferencias significativas Test de Tukey

Reptiles	Media	Grupo
Cobra	0,02	a
Atrox	0,03	b

Realizado por: Ariel Torres, 2018

La absorbancia del veneno de cobra es de 0,02 valor que difiere significativamente del veneno del reptil B. atrox puesto que se registró una absorbancia de 0,03. Indicando que existe una mayor cantidad de inhibición en la hialuronidasa del veneno de cobra.

Tabla 21-3 Diferencias significativas
por concentraciones Test de Tukey

Concentración	Media	Grupo
control	0,031	a
1000	0,028	b
250	0,024	c
50	0,022	d
25	0,022	d
12,5	0,022	d
6,25	0,021	e

Realizado por: Ariel Torres, 2018

La absorbancia de los venenos de los reptiles fue de 0,031 valor que difiere significativamente del resto puesto que al usar diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Piper peltatum* a concentraciones de 1000, 250, 50, 12,5, 6,25 la absorbancia se redujo a 0,028 0,024 0,022 0,022 0,022 0,021 respectivamente. Esto se debe a que a menor concentración del extracto *Piper peltatum* hay mayor efecto inhibitorio.

Tabla 22-3 Diferencias significativas de las concentraciones en función de todos
los tiempos del análisis de los venenos de serpientes Test de Tukey

Inter. AB	Media	Grupo
A1B0	0,031	a
A1B1	0,026	c
A1B2	0,022	f
A1B3	0,020	g
A1B4	0,019	h
A1B5	0,019	h
A1B6	0,018	i
A2B0	0,032	a
A2B1	0,030	b
A2B2	0,026	c
A2B3	0,024	d
A2B4	0,024	d
A2B5	0,024	d
A2B6	0,024	d

Realizado por: Ariel Torres, 2018

Al evaluar la absorbancia del veneno de cobra *Naja naja* y *B. atrox* sin el extracto, se registró absorbancias de 0,032 y 0,031 valores que difieren significativamente del resto de concentraciones puesto que la absorbancia va reduciendo en los 2 casos siendo mas evidente la

absorbancia al usar el extracto de *Piper peltatum* en el veneno de de cobra puesto que se redujo hasta 0,08 y esto se debe a la variabilidad de los venenos entre los generos *Naja* y *Bothrops* (De Roodt *et al.*, 2005, p.19).

CONCLUSIONES

- ❖ Mediante el tamizaje fitoquímico se identificó los compuestos existentes en el extracto de hojas de *Piper peltatum* los cuales fueron alcaloides, azúcares, flavonoides, fenoles, terpenos.
- ❖ Se determinó la presencia de fenoles $14,49 \pm 1,2$ mg GAE/g de extracto de planta y flavonoides $14,53 \pm 0,208$ mg de Quercetina/g de extracto seco de *Piper peltatum*, comparado a otras investigaciones bibliográficas se determinó que la cantidad de fenoles podría ser significativamente menor respecto a la especie que se ha investigado, mientras que en los flavonoides los valores se asemejan.
- ❖ Se realizó el control de calidad de *Piper peltatum* mediante pruebas de Humedad, Cenizas Totales, Cenizas solubles en agua, y cenizas insolubles en ácido Clorhídrico, todos los valores obtenidos cumplieron con los límites establecidos por la USP #35, demostrando eficiente operatividad en el proceso de secado, conservación y el almacenamiento de la planta.
- ❖ Se determinó la actividad inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos de *Piper peltatum*, sobre la enzima hialuronidasa bovina, su efecto disminuye significativamente a concentraciones mayores a 250 ppm, obteniéndose un mayor efecto inhibitorio a la concentración de 250 ppm y a un tiempo de 180 seg.
- ❖ Mediante el análisis estadístico, se demostró que la inhibición fue mayor con una media de un 28,07% en el veneno de cobra *Naja Atra*, difiriendo significativamente con el veneno de *Bothrops atrox*, donde se reportó una inhibición mucho menor de 14,96%. Esto puede darse por la variabilidad genética de las dos especies, y la cantidad de hialuronidasa presente en el veneno.

RECOMENDACIONES:

- ▶ A la hora de efectuar el análisis enzimático es necesario tener un espacio limpio libre de impurezas que puedan afectar o alterar el análisis, de la misma manera los materiales deben estar bien limpios y secos debido a la sensibilidad de la enzima.
- ▶ Es aconsejable realizar un estudio de la actividad con otros modelos experimentales *in vivo*.
- ▶ Se recomienda realizar esta investigación con venenos de otras de serpientes debido a su uso tradicional en las mordeduras.

BIBLIOGRAFIAS

Bala, E.et al. "A biological overview of Hyaluronidase : A venom enzyme and its inhibition with plants materials". *Materials Today: Proceedings* [en línea], 2018, vol. 5, no. 2, pp. 6406-6412.[consulta:06 octubre 2018] ISSN 2214-7853. DOI 10.1016/j.matpr.2017.12.252. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785317332406>.

Bernardoni, J.L.et al. "Functional proteomic analyses of Bothrops atrox venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon". *Journal of Proteomics*[en línea], 2017, pp. 1-45 [consulta: 06 octubre 2018], ISSN 1874-3919. DOI 10.1016/j.jprot.2017.03.003. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28274896>

Betancur, R.A.M. "Envenenamiento por mordedura de serpiente". *Actualizaciones en Anestesiología y Reanimación* [en línea], 2009 vol. 19, no. 3, pp. 113-119.[consulta: 08 marzo 2018], ISSN 11320095. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-envenenamiento-por-mordedura-serpiente-13038574.

Bosio, M. y Celestino, J. *Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada* [en línea]. Madrid- España: Cultura Hispanica. 1997 [consulta:08 de marzo 2018] Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jose_Cardiel/publication/281624520_Dichapetalaceae_In_J_C_Mutis_Flora_de_la_Real_Expedicion_Botanica_de_Nuevo_Reyno_de_Granada/links/55f03e8b08aef559dc46618e/Dichapetalaceae-In-J-C-Mutis-Flora-de-la-Real-Expedicion-Botanica-de-Nuevo-Reyno-de-Granada.pdf.

Da silva, et al. "New antimalarial and cytotoxic 4-nerolidylcatechol derivatives". [en línea], 2009 vol. 44, pp. 2731-2735.[consulta: 06 octubre 2018], DOI 10.1016/j.ejmech.2008.10.025. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523408005394>.

De roodt, A.etal, "Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México". *Gaceta Medica de Mexico* [en línea], 2005 vol. 141, no. 1, pp. 13-21.[consulta: 25 octubre 2018], ISSN 00163813. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/gmm/v141n1/v141n1a3.pdf>.

Diario «LA HORA», *Ecuador Incrementan casos de mordeduras de serpientes País La Hora Noticias de Ecuador, sus provincias y el mundo.* [en línea]. Quito- Ecuador, 22 marzo 2017.[consulta: 08 marzo 2018]. Disponible en: <https://lahora.com.ec/noticia/1102041470/ecuador-incrementan-casos-de-mordeduras-de-serpientes->.

Dyer, L.A. y Palmer, D. *Piper : A Model Genus for Studies of Phytochemistry , Ecology , and*

Evolution [en línea]. New York: Springer. 2004 ISBN 9781475710083. [consulta 06 de octubre 2018] Disponible en: http://library1.org/_ads/0C52B3C141B611B9B90BAECF220E7535.

Gómez, J.P., Gómez-Cabal, C. y Gómez-Cabal, M.L. "Sueros antiofídicos en Colombia: análisis de la producción, abastecimiento y recomendaciones para el mejoramiento de la red de producción". *Revista Biosalud* [en línea], 2017. vol. 16, no. 2, pp. 96-116.[consulta: 10 abril 2018] DOI 10.17151/biosa.2017.16.2.9. Disponible en: www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1657-95502017000200096&lng=en&nrm=iso&tlng=es.

Gopalakrishnakone, P. y Calvete, J.J. *Venom Genomics and Proteomics* [en línea]. London-Inglaterra: Springer. 2016. ISBN 9789400764156.[consulta: 06 octubre 2018] Disponible en: <https://www.springer.com/us/book/9789400764156>.

Liyanaarachchi, G.D.et al."Tyrosinase, elastase, hyaluronidase, inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals". *Industrial Crops and Products* [en línea], vol. 111, no. November 2017, pp. 597-605.[consulta:10 marzo 2018]. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.11.019. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.019>.

Mencías, E. y Mayero, L. *Manual de Toxicología Básica* [en línea]. 5ta. Madrid España: s.n. , 2000. ISBN 978-84-7978-436-2.[consulta:11 marzo 2018] Disponible en: lib1.org/_ads/77B72756A54166F2ADEE360700590B69.

Mikhail, A., Boykov, P.Y. y Khabarov, V. *HYALURONIC ACID* [en línea]. Moscú-Rusia: WILEY, 2015. ISBN 9781118633793.[consulta: 06 septiembre 2018]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118695920>.

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. *Gaceta Epidemiologica semanal No.50.* [en línea], Quito: Ana Sotalín, 2017. [Consulta: 15 enero 2018]. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/Gaceta-General-SE50.pdf>.

Miranda, M. *Farmacognosia y Productos Naturales : Normas Ramales de Drogas Crudas Y extractos Y Tinturas.* 6ta. Habana- Cuba: 2006.

Pacheco, A.O et al."Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana". *Redalyc* [en línea], 2013, (Cuba) vol. 44, no. 1, pp. 52-59.[Consulta: 10 Octubre 2018]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57929946007.pdf>.

Pérez, Y, Rodríguez, L.E. Y Aguilar, B. "Caracterización físico-química de extractos de

Spondias mombin L" . *Scielo* [en línea], 2016, (cuba) vol. 28, no. 1, pp. 444-449.[consulta: 15septiembre 2018]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212016000100008.

PUERTAS-MEJÍA I, et al. "Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de Piper peltatum L". *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [en línea], 2009, (Colombia) vol. 14, no. 2, pp. 1-11. [consulta: 12 septiembre 2018] ISSN 10284796. DOI 10.1016/j.jep.2010.10.039. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v14n2/pla07209.pdf>.

RAJ, K. et al. "Evaluation of anti-oxidant activities and total phenol and flavonoid content of the hydro- alcoholic extracts of Rhodiola sp" . *Pharmacognosy Journal* [en línea], 2010,(India) vol. 2, no. 11, pp. 431-435.[consulta: 15 septiembre 2018]. ISSN 0975-3575. DOI 10.1016/S0975-3575(10)80027-6. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0975-3575\(10\)80027-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0975-3575(10)80027-6).

RATNASOORIYA, W.D.et al. "In vitro anti-hyaluronidase activity of Sri Lankan low grown orthodox orange pekoe grade black tea (Camellia sinensis L.)". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [en línea], 2014, (sri Lanka) vol. 4, no. 12, pp. 959-963. [consulta: 15 marzo 2018].ISSN 22211691. DOI 10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0462. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115301118>.

Rios, M. *Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, Retos y Perspectivas*. Quito- Ecuador: Abya-Yala. 2007 pp.470-471.

Rover, M.R. y Brown, R.C. "Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin–Ciocalteu method". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* [en línea], 2013, (United State of America) pp. 1-6.[consulta:25 septiembre 2018]. ISSN 0165-2370. DOI 10.1016/j.jaap.2013.06.011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>.

Sánchez, A., 2015. «Evaluación de la actividad cicatrizante in vitro del geranio (*pelargonium x domesticum* L.h. Bailey) mediante inhibición de hialuronidasa» [en línea](tesis). (Pregrado) Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba, Ecuador. 2015 pp.45-50 . Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4612/1/56T00594 UDCTFC.pdf>.

Shan, L. et al."Proteomic characterization and comparison of venoms from two elapid snakes (Bungarus multicinctus and Naja atra) from China". *Journal of Proteomics* [en línea], 2016, (China) vol. 138, pp. 83-94.[consulta:02 octubre 2018]. ISSN 1874-3919. DOI 10.1016/j.jprot.2016.02.028. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.028>.

Soto Vásquez, m.r. "Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de

Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedentes de la región Amazonas". *In Crescendo* [en línea], 2015, (Peru) vol. 6, no. 1, pp. 33-43.[consultado: 12 Marzo 2018] ISSN 2307-5260. DOI <https://doi.org/10.21895/in%20cres.v6i1.824>. Disponible en: <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo/article/view/824/438>.

Süntar, I.et al. "Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by in vivo and in vitro experimental models". *Journal of Ethnopharmacology*, [en línea], 2012, (Tuquia)vol. 139, no. 2, pp. 533-540. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2011.11.045.Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111008543>

Varea, a. et al.. *Biodiversidad, bioprospección y bioseguridad* [en línea]. Quito- Ecuador: Abya-Yala, 1997 ISBN 9978-04-306-3. [consulta: 16 Marzo 2018] Disponible en: biblio.flacsoandes.edu.ec/catalog/resGet.php?resId=48901.

Velázquez, C.et al." Total phenolic compounds in milk from different species . Design of an extraction technique for quantification using the Folin – Ciocalteu method".*Food Chemistry* [en línea] 2015, (Mexico) vol. 176, pp. 480-486. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.12.050. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624259>

World Health Organization. *Mordeduras de serpientes venenosas. Who* 2017 [en línea]. [Consulta: 8 marzo 2018]. Disponible en: www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming.

ANEXOS

Anexo A. Preparación del tamizaje fitoquímico



Grafico 1A: Ensayo de cloruro férrico, resinas, y Borntrager.



Grafico 2A: Ensayo de alcaloides y baljet.

Anexo B. Análisis de calidad del extracto

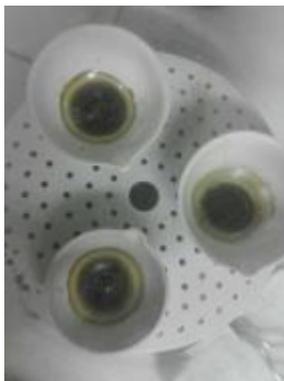


Grafico 1B: Analisis de sólidos totales disueltos

Anexo C: Inhibición de la hialuronidasa



Grafico 1C: Agregando la hialuronidasa



Grafico 2C: Incubar a 37°C



Grafico 3C: colocando a agua hirviendo



Grafico 4C: Reacción con p-dimetilbenzaldehido

Anexo D: Guia de movilización de la especie vegetal



MINISTERIO DEL AMBIENTE



GUIA DE MOVILIZACIÓN

Nro. MAE-DPAS-FAU-2018-041

Fecha de emisión: Nueva Loja, 06 de Noviembre del 2018 a las 10:10.

Fecha de movilización: 07 de Noviembre del 2018 Válido hasta: 08 de Noviembre del 2018 hasta 24:00 pm. (24 horas)

La Dirección Provincial de Sucumbios, Autoriza a: Gisela Alexandra Pilco Bonilla de Nacionalidad Ecuatoriana con número de cedula N° 0603914318, para la movilización de especímenes de flora: desde la provincia de Sucumbios hasta la ciudad de Riobamba al Herbario de la ESPOCH con sede en Riobamba, donde se dará continuidad al proyecto de investigación, las muestras se movilizaran vía terrestre en transporte Publico Cooperativa Baños, de acuerdo a la siguiente lista:

Código	Orden	Nombre Científico	Familia	Descripción del espécimen o parte constitutiva	Provincia	Estado
S/N	S/N	Piper peltatum	Piperacea	Completa	Sucumbios	Fresco

Observaciones:

Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en: Transporte Terrestre.

La presente guía se emite cumpliendo las disposiciones dadas en el Permiso de Investigación Nro. MAE-DNB-CM-2018-0086

Los especímenes van en calidad de:

Investigación (86)

Investigación Nro. MAE-DNB-CM-2018-0086.

Nombre de la Investigación: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE"

Dirección Provincial
de Sucumbios
Firma

DIRECTOR PROVINCIAL

Sello Dirección Provincial.

Firma

BENEFICIARIO
CI 31006302-4

Anexo E: Certificado de identificación de la especie vegetal



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericano sur Km 1, kmc (B3) 2 998 200 ext. 70023, jcarangui@yaho.com
Ecuador

CERTIFICADO

8 de noviembre del 2018

A quien interese:

Certifico que el señor Torres Aguilar Ariel Benjamin con CI: 210063502-4, estudiante de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, entregó e identificó 1 muestra de *Piper pellatum* L., según autorización de Investigación MAE-DNB-CM-2018-0086; colectada en Shushufindi, Sucumbios. La muestra entregada será procesada en el herbario en un tiempo determinado.

Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y la interesada puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.




Ing. Jorge Carangui Msc.
BOTÁNICO