



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE RAÍZ DE *Piper peltatum* L.
EN *Rattus norvegicus*”.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL

Presentado para optar por el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: MARÍA BELÉN MOYANO AGUAY

TUTORA: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2019

©2019, María Belén Moyano Aguay

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 “**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE RAÍZ DE *Piper peltatum* L. EN *Rattus norvegicus*”, de responsabilidad de la señorita María Belén Moyano Aguay, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.**

FIRMA

FECHA

Lic. Karen Lisseth Acosta León, M.Sc.

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, María Belén Moyano Aguay, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

María Belén Moyano Aguay

060374524-1

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de estar viva, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente con su sabiduría para alcanzar mis objetivos y por ponerme en el lugar y tiempo perfecto.

A mis padres Mercedes y Vicente por estar conmigo dándome su apoyo incondicional en cada momento y creer en mí, por ser esos padres que con esfuerzo y sacrificio supieron sacar a sus hijos adelante, todo esto se los debo a ustedes.

A mis hermanos y hermanas Oscar, Vicente, Patricio, Daniela y Mónica que indudablemente han sido un ejemplo a seguir, gracias por sus palabras y consejos.

A mis amigas, amigos y enamorado que han sido mi soporte en todo este tiempo, gracias por la paciencia y el cariño brindado, por cada momento que se ha compartido del cual se ha formado grandes experiencias que las llevo en mi corazón como los mejores recuerdos de mi vida universitaria.

María Belén.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por permitir formarme como persona y como profesional.

A la Lcda. Karen Acosta, por confiar en mí y brindarme su apoyo durante la realización de esta investigación.

Al Bqf. Diego Vinueza por compartir con nosotros sus conocimientos y aprendizajes nos ha enseñado a que no debemos limitarnos ya que somos muy capaces de cumplir con nuestros objetivos, por ser de gran ayuda y apoyo en la realización de esta investigación.

Al Bqf. Benjamín Román, Bqf. Yolanda Buenaño e Ing. Karla Haro técnicos docentes de cada uno de los laboratorios en los cuales hice mi investigación gracias por la paciencia y la ayuda brindada de su parte.

María Belén.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	3
1.1. Bases teóricas	3
1.1.1. Diuréticos	3
<i>1.1.1.1. Diuresis</i>	<i>3</i>
1.1.2. Clasificación de los diuréticos	4
<i>1.1.2.1. Diuréticos de eficacia elevada</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2.2. Diuréticos de eficacia moderada</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2.3. Diuréticos de eficacia escasa</i>	<i>5</i>
1.1.3. Hipertensión Arterial	6
1.1.4. Electrolitos potasio, sodio, cloro y calcio	6
1.1.5. Plantas medicinales como diuréticos	7
<i>1.1.5.1. Indicaciones de las plantas medicinales como diuréticos</i>	<i>8</i>
1.2.5 Familia Piperaceae	8
<i>1.2.5.2 Piper peltatum L.</i>	<i>9</i>
<i>1.2.5.3 Descripción botánica de Piper peltatum</i>	<i>9</i>
<i>1.2.5.4 Sinónimos de Piper peltatum</i>	<i>9</i>
<i>1.2.5.5 Clasificación taxonómica de Piper peltatum</i>	<i>10</i>
<i>1.2.5.6 Hábitat y distribución de Piper peltatum</i>	<i>10</i>
<i>1.2.5.7 Usos etnomédicos y modo de empleo de Piper peltatum</i>	<i>11</i>
<i>1.2.5.8 Composición Química</i>	<i>11</i>
<i>1.2.5.9 Actividad farmacológica y biológica</i>	<i>12</i>
1.2.6 Experimentación en animales de laboratorio	12
<i>1.2.6.1 Rattus norvegicus</i>	<i>13</i>
<i>1.2.6.2 Volúmenes de dosificación para diferentes vías de administración</i>	<i>14</i>
<i>1.2.6.3 Vías de administración</i>	<i>15</i>

CAPÍTULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	17
2.1	Lugar de investigación.....	17
2.2	Recolección e identificación del material vegetal	17
2.3	Materiales, equipos y reactivos	17
2.3.1	Material vegetal.....	17
2.3.2	Material biológico.....	18
2.3.3	Fármaco de referencia	18
2.3.4	Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados.....	18
2.4	Métodos y Técnicas	21
2.4.1	Recolección, lavado y secado del material vegetal.....	21
2.4.2	Parámetros de control de calidad aplicados a la droga cruda	21
2.4.2.1	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	<i>21</i>
2.4.2.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	<i>22</i>
2.4.2.3	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	<i>22</i>
2.4.2.4	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	<i>23</i>
2.4.3	Tamizaje fitoquímico	24
2.4.3.2	<i>Ensayo de Sudan.....</i>	<i>26</i>
2.4.3.3	<i>Ensayo de Dragendorff, Mayer, Wagner</i>	<i>27</i>
2.4.3.4	<i>Ensayo de Baljet</i>	<i>27</i>
2.4.3.5	<i>Ensayo de Borntrager.....</i>	<i>28</i>
2.4.3.6	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard</i>	<i>28</i>
2.4.3.7	<i>Ensayo de catequinas.....</i>	<i>29</i>
2.4.3.8	<i>Ensayo de resinas</i>	<i>29</i>
2.4.3.9	<i>Ensayo de Fehling.....</i>	<i>29</i>
2.4.3.10	<i>Ensayo de la espuma.....</i>	<i>30</i>
2.4.3.11	<i>Ensayo del cloruro férrico</i>	<i>30</i>
2.4.3.12	<i>Ensayo de Shinoda.....</i>	<i>30</i>
2.4.3.13	<i>Ensayo de antocianidinas</i>	<i>31</i>
2.4.3.14	<i>Ensayo de mucílagos.....</i>	<i>31</i>
2.4.3.15	<i>Ensayo de principios amargos y astringentes.....</i>	<i>32</i>
2.4.4	Control de calidad del extracto alcohólico.....	32

2.4.4.1	<i>Requisitos organolépticos</i>	32
2.4.4.2	<i>Determinación de densidad relativa</i>	32
2.4.4.3	<i>Índice de refracción</i>	33
2.4.4.4	<i>Medición de pH</i>	33
2.4.4.5	<i>Determinación de sólidos totales</i>	33
2.4.5	Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>Piper peltatum</i> L.	33
2.4.6	Determinación de Flavonoides Totales	34
2.4.7	Determinación de Fenoles Totales Mediante el Método de Folin-Ciocalteu.	34
2.4.8	Determinación del potencial antioxidante de raíces de <i>Piper peltatum</i> L. por el método DPPH.	34
2.5.8	Evaluación de la actividad diurética de las raíces de <i>Piper peltatum</i> L.	35
2.5.9	Determinación de electrolitos en orina	36
2.5.10	Análisis estadístico:	37
CAPÍTULO III		
3	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
3.1	Control de calidad de la Droga Cruda	38
3.2	Tamizaje Fitoquímico	39
3.3	Control de calidad realizado al extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Piper peltatum</i> L.	41
3.4	Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	42
3.5	Cuantificación de Flavonoides Totales	43
3.6	Capacidad Antioxidante	44
3.7	Evaluación de la actividad diurética de la raíz de <i>Piper peltatum</i> L. en <i>rattus norvegicus</i>	46
3.8	Evaluación de los electrolitos urinarios	48
3.9	Análisis estadístico	50
CONCLUSIONES		52
RECOMENDACIONES		53
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 1: La nefrona y sitio de acción de los diuréticos.....	4
Figura2-1: <i>Piper peltatum</i> L.....	9
Figura 3-1: <i>Rattus norvegicus</i>	13
Figura 4-1: Calibre de aguja y volumen de dosificación recomendado para diferentes vías de administración.....	15
Figura 1-2: Esquema para el tamizaje fitoquímico.....	25
Figura 2-2: Esquema de ensayos fitoquímicos del extracto etéreo.....	25
Figura 3-2: Esquema de ensayos fitoquímicos del extracto alcohólico.....	26
Figura 4-2: Esquema de ensayos fitoquímicos del extracto acuoso.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica de <i>Piper peltatum</i> L.....	10
Tabla 2-1: Información taxonómica de <i>Rattus Norvegicus</i>	14
Tabla 1-2: Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados.....	18
Tabla 2-2: Condiciones en las que se mantuvieron los animales de experimentación.....	36
Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de la raíz de <i>Piper peltatum</i> .L	38
Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso.	39
Tabla 3-3: Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de raíz de <i>Piper peltatum</i> L.....	42
Tabla 4-3: Resultados de la cuantificación de Fenoles Totales.....	43
Tabla 5-3: Resultados de la Cuantificación de Flavonoides.....	44
Tabla 6-3: Resultado de la Capacidad Antioxidante del extracto Hidroalcohólico liofilizado de raíz de <i>Piper peltatum</i> L.....	45
Tabla 7-3: Efecto de la raíz de <i>Piper peltatum</i> L. en el volumen de orina utilizando ratas de laboratorio en un intervalo de 6 horas.....	46
Tabla 8-3: Volumen de orina excretada por las ratas de laboratorio por influencia del extracto de raíz de <i>Piper peltatum</i> L.....	47
Tabla 9-3: Efecto de la raíz de <i>Piper peltatum</i> L.sobre la excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio en muestra de orina de 6 horas.....	48
Tabla 10-3: Efecto natriurético, salurético e inhibición de la anhidrasa carbónica de la raíz de <i>Piper peltatum</i> L. en ratas de laboratorio en muestras de orina recogidas por 6 horas.....	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Curva de la concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado de raíz de <i>Piper peltatum</i> L.....	45
Gráfico 2-3: Excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio por influencia de las diferentes dosis administradas.....	48
Gráfico 3-3: Tratamientos v.s Estándar Test de Dunnett.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Recolección, secado y triturado de la raíces de *Piper peltatum*

ANEXO B. Determinación del contenido de humedad de las raíces del material vegetal

ANEXO C. Determinación del contenido de cenizas totales (Gráfico 1C), cenizas solubles en agua (Gráfico 2C) y cenizas insolubles en ácido clorhídrico del material vegetal (Gráfico 3C).

ANEXO D. Tamizaje fitoquímico de los extractos: etéreo (Gráfico 1D), metanólico (Gráfico 2D) y acuoso de las raíces de *Piper peltatum*. (Gráfico 3D)

ANEXO E. Control de calidad del extracto hidroalcohólico de la muestra de ensayo

ANEXO F. Obtención del extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.

ANEXO G. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de tricloruro de aluminio (Gráfico 1G) y los flavonoides mediante el método de Folin Ciocalteu (Gráfico 2G)

ANEXO H. Curva de calibración del ácido gálico (Gráfico 1H) y de la quercetina (Gráfico 2H) utilizados para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

ANEXO I. Determinación del potencial antioxidante de raíz de *Piper peltatum* L. mediante el método DPPH (2,2-Difinil-1-Picrilhidrazilo)

ANEXO K. Evaluación de la actividad diurética en *rattus norvegicus*: caja metabólica (Gráfico 1K) y recolección de la muestra (Gráfico 2K)

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Piper peltatum* L., en ratas albinas de laboratorio (*Rattus norvegicus*). Para evaluar la actividad diurética se utilizaron 25 hembras con pesos comprendidos entre 160-240 g, a los que se administraron los siguientes tratamientos por vía oral: extracto hidroalcohólico (25, 100 y 200 mg/kg), control positivo (furosemida 10 mg/kg) y vehículo (carboximetilcelulosa 0,9% p/v). Posteriormente, a un intervalo de 6 horas de la administración de los tratamientos se registraron los volúmenes de orina total excretada y electrolitos. Por otra parte, en el material vegetal se comprobó la presencia de compuestos grasos, lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, alcaloides, catequinas, azúcares reductores, fenoles, taninos, saponinas y flavonoides, mediante la realización del tamizaje fitoquímico. El contenido de compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico determinado a través de método de Folin Ciocalteu fue de 274.86 ± 3.27 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco, mientras que el contenido de flavonoides obtenido por el método de quelación con $AlCl_3$ fue de 86.62 ± 13.67 mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco. La actividad antioxidante que presentó la planta a una concentración de 1000 ppm fue de 36.95%. Se comprobó el efecto diurético del extracto de la raíz de *Piper peltatum* L., a tres dosis (25 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg), observando que no existieron diferencias estadísticamente significativas respecto al fármaco de referencia (furosemida).

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <DIURESIS>
<FLAVONOIDES>, <FENOLES>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE >,
<SANTAMARÍA (*Piper peltatum* L.)>, <RATONES (*Rattus norvegicus*)>.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the diuretic activity of the hydroalcoholic extract of the root of *Piper peltatum* L., in laboratory albino rats (*Rattus norvegicus*). To evaluate the diuretic activity, 25 females with weights between 160-240 g were used, to which the following treatments were administered orally: hydroalcoholic extract (25, 100 and 200 mg / kg), positive control (furosemide 10 mg / kg) and vehicle (carboxymethylcellulose 0.9% w/v). Subsequently, at an interval of 6 hours from the administration of the treatments, the volumes of excreted total urine and electrolytes were recorded. On the other hand, in the vegetal material the presence of fatty compounds, lactones, coumarins, triterpenes, steroids, alkaloids, catechins, reducing sugars, phenols, tannins, saponins and flavonoids was verified, by means of the photochemical screening. The content of phenolic compounds in the hydroalcoholic extract determined through the Folin Ciocalteu method was 274.86 ± 3.27 mg equivalents of gallic acid/g of dry extract, while the flavonoid content obtained by the chelation method with $AlCl_3$ was 86.62 ± 3.67 mg equivalents of quercetin/g of dry extract. The antioxidant activity presented by the plant at a concentration of 1000 ppm was 36.95%. The diuretic effect of the root extract of *Piper peltatum* L. was checked at three doses (25 mg / kg, 100 mg / kg, 200 mg / kg), observing that there were no statistically significant differences with respect to the reference drug (furosemide).

Keywords: <BIOCHEMISTRY>. <PHARMACOLOGY>, <DIURESIS> <FLAVONOIDS>. <FENOLES>. <ANTIOXIDANT ACTIVITY>, <SANTAMARÍA (*Piper peltatum* L.)>. <MICE (*Rattus norvegicus*) >.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca del 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional, también reconoce la importancia del uso de los medicamentos herbarios en la salud de los individuos, por lo que establece que los países necesitan información actualizada sobre las propiedades beneficiosas y posibles efectos de estos medicamentos. Ante esta situación, la OMS acordó apoyar y promocionar proyectos de investigación científica, así como también apoyar al uso racional de aquellos productos (Organización Mundial de la Salud, 2013,p.16).

Los diuréticos son medicamentos que se utilizan en el tratamiento de estados edematosos asociados a enfermedades como: hipertensión arterial, diabetes insípida, edema pulmonar, edema cerebral y nefritis. También pueden llegar a provocar reacciones adversas debido al uso concomitante como: hipopotasemia, hipocalcemia, ototoxicidad, deshidratación, hipomagnesemia e hiperuricemia, deterioro de la función sexual y disfunción renal (Mora, 2015, a: p.29). Por ello, resulta importante la búsqueda de nuevos diuréticos que proporcionen menores efectos adversos y sean de fácil acceso a las poblaciones de bajos recursos económicos.

La presión arterial es una enfermedad que constituye uno de los principales factores de riesgo de derrames cerebrales e insuficiencia renal, es difícil de controlar y afecta a la población. Estudios recientes informan que las plantas con acción diurética reducen la presión arterial razón por la cual es importante investigar plantas con esta actividad así como también sus compuestos (Noriega, 2015, p.9). Hoy en día los diuréticos tiazídicos son utilizados para tratar la hipertensión primaria ya que se caracterizan por producir un efecto terapéutico a bajas concentraciones llegando a ser de primera elección en pacientes hipertensos, incluso en ancianos ya que disminuyen los efectos adversos mejorando la calidad de vida del paciente (Model, 2016b: p.2).

El Ecuador cuenta con innumerables especies vegetales con propiedades medicinales, sin embargo muchos de los conocimientos se han ido perdiendo debido a que la mayoría de especies utilizadas cuentan con muy poca información por lo que es necesario elaborar métodos experimentales que respalden el uso y den referentes sobre su efectividad, toxicidad e identificación de metabolitos (Tinitana et al., 2016, a, p.13).

Piper peltatum L. es un sub-arbusto localizado al centro-norte del Ecuador, es muy utilizado en los pueblos amazónicos como: diurético, antipirético, antiinflamatorio, abortivos, vermífugos colagogo, colerético entre otros (Vásquez, 2015, p.35). En estudios etnobotánicos realizados a esta especie, se encontró que las raíces molidas tienen actividad contra el VIH debido a que en su composición presentan sustancias como el peltatol A, B, C, capaces de inhibir la muerte celular inducida por VIH-1 a concentraciones sub-citotóxicas entre 1-10 µg/mL (Gustafson, 1992, pp.2809-2811).

Pinto y colaboradores (2006b, pp. 205-211), efectuaron un estudio de citotoxicidad, del 4-nerolidilcatecol presente en los extractos metanólico y etanólico de la raíz de *P. peltatum*, mostrando una actividad citotóxica moderada a alta contra las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama humano), HCT-8 (cáncer de colon humano) y melanoma B16, CEM y HL-60 (leucemia humana).

Este trabajo de titulación tuvo como objetivo determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L. en *Rattus norvegicus* y medir la concentración de electrolitos presentes en la orina después de la administración del extracto en un periodo de 6 horas. Este estudio podría ofrecer una alternativa terapéutica para las personas que sufren enfermedades renales o arteriales y que han enfrentado reacciones adversas al utilizar medicamentos sintéticos como la furosemida y proporcionar al paciente una mejor calidad de vida.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L. en *Rattus norvegicus*.

Objetivos Específicos

- Determinar los grupos fitoquímicos del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L.
- Cuantificar la cantidad de flavonoides y fenoles totales del extracto hidroalcohólico de raíz de la especie vegetal mediante los métodos: Folin Ciocalteu y quelación con $AlCl_3$.
- Determinar la actividad captadora de radicales libres del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L., mediante el método DPPH.
- Comprobar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L. mediante el registro del volumen de orina y determinación de sodio, potasio y cloro en *Rattus norvegicus*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Bases teóricas

1.1.1. *Diuréticos*

Los diuréticos son drogas que actúan sobre los riñones e incrementan el volumen urinario al reducir la reabsorción de sal y agua desde los túbulos (Lüllmann et al., 2010: p.158). Son utilizados en el tratamiento de edemas y tienden a modificar otros iones de manera directa o indirecta alterando así otras funciones, por lo que resultan útiles en otro tipo de enfermedades como: hipertensión arterial, diabetes insípida, glaucoma, hipercalcemias e intoxicaciones (Mora, 2015, a: p.29)

Los diuréticos son utilizados de forma limitada debido a que presentan efectos adversos como: hipopotasemia, hipocalcemia, ototoxicidad, deshidratación, hipomagnesemia e hiperuricemia (Lüllmann et al., 2010: p.158).

1.1.1.1. *Diuresis*

La diuresis es la excreción aumentada de orina en un tiempo determinado, se origina por la alteración del transporte iónico a lo largo de la nefrona. (Hohenfellner y Santucci, 2007: p.115)

Los diuréticos no solo eliminan sodio también pueden modificar cationes como: K^+ , H^+ , Ca^{++} , y Mg^{++} , aniones como: Cl^- , HCO_3^- , $H_2PO_4^-$ y ácido úrico, además modifican la hemodinámica renal. (Wilkins, 2007, p.207)

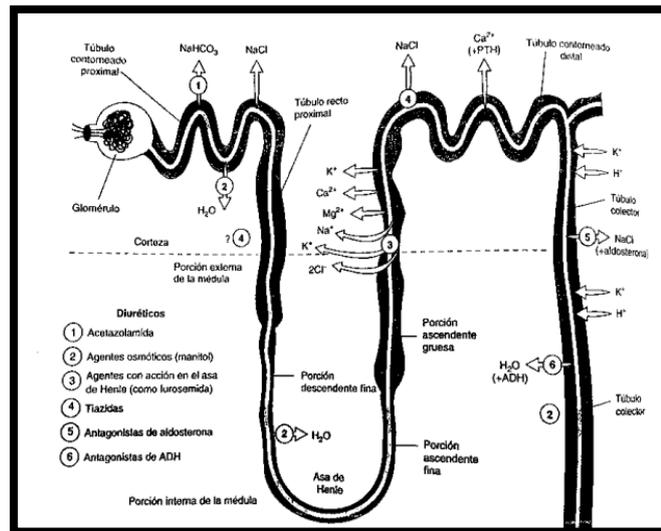


Figura 1-1: La nefrona y sitio de acción de los diuréticos

Fuente: (Jarillo, 2017, p.11)

1.1.2. Clasificación de los diuréticos

1.1.2.1. Diuréticos de eficacia elevada

Son diuréticos que se absorben bien por vía oral tienen una biodisponibilidad del 50%, la acción por esta vía inicia de 10 a 30 minutos posteriores a su administración y alcanzan su máxima actividad a los 20-40 min con una duración de 4 a 6 horas, la eliminación de Na^+ es superior al 15%, entre los fármacos más importantes se enuncian los siguientes: Sulfamiloilbenzoatos (furosemida, bumetanida, piretanida, azosemida), el derivado de las sulfonilureas (torasemida), el derivado del ácido fenoxiacético (ácido etacrínico) y otros como (etozolina y muzolimina) (Fernández, 2015; Lüllmann et al., 2010).

Mecanismo de Acción: La furosemida y los demás diuréticos de asa se fijan a la proteína cotransportadora $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ ubicada en el segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle y la inhibe impidiendo el transporte de iones, también impide que el Ca^{2+} y Mg^{2+} sea reabsorbido e incrementa su eliminación. Las consecuencias electrolíticas que causan este tipo de diuréticos es que provocan un rápido e intenso aumento en la eliminación urinaria de Cl^- , Na^+ y K^+ , la eliminación del K^+ se produce al aumentar la carga de Na^+ que llega al túbulo distal produciendo un intercambio a ese nivel, sin embargo esta pérdida es inferior a la que producen las tiazidas para una acción natriurética determinada, la furosemida presenta también una acción salurética. Sin embargo se ha encontrado una relación entre la eliminación de Na^+ y K^+ y el volumen de orina, aproximadamente en similar proporción con valores cercanos a 1 al calcular el cociente de Na^+/K^+ (Lüllmann et al., 2010:p.158).

Los efectos adversos que provocan estos diuréticos son erupción cutánea, pancreatitis, acufenos, vértigo, sordera, agranulocitosis y fotosensibilidad (Jarillo, 2017, pp.12-13).

1.1.2.2. *Diuréticos de eficacia moderada*

Desde el punto de vista terapéutico este grupo es el más importante ya que son utilizados ampliamente en la hipertensión arterial, diabetes insípida y en la hipercalciuria el Na^+ es eliminado del 5 al 10%. En este grupo se encuentran: benzodiacepinas (tiazidas e hidrotiazidas) de igual manera la clorotiazida, hidroclorotiazida, metozalona, clortalidona, quinetazona entre otros. (Novaes et al., 2014a: p.3)

Las tiazidas a diferencia de los diuréticos de asa tienen una actividad farmacológica después de 2 horas de su administración proporcionando un efecto terapéutico más prolongado apreciándose diuresis aun a las 8 horas de tratamiento.

Mecanismo de acción: Los diuréticos tiazídicos actúan desde la superficie luminal de la célula epitelial en la porción inicial del túbulo contorneado distal donde se van a fijar al contrantransportador $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ y lo inhibe, interfiriendo con la corriente iónica, provocando una moderada eliminación urinaria, también inducen a un aumento notable de eliminación de K^+ (Fernández, 2015, p.24). Sin embargo, la relación Na^+/K^+ valorada para este tipo de control en algunos estudios mencionan valores menores a 1, con un aumento en la eliminación de K^+ (Lüllmann et al., 2010:p.158).

1.1.2.3. *Diuréticos de eficacia escasa*

Los fármacos de eficacia escasa se subclasifican según el lugar de acción:

- ❖ **Diuréticos ahorradores de potasio:** Se le conoce también como inhibidores de la aldosterona porque bloquean los receptores de esta hormona frenando la reabsorción de agua y sodio, actúan en el último segmento del túbulo contorneado distal y en la porción inicial del túbulo colector, poseen un débil efecto diurético ya que inhiben en un 5% la reabsorción del sodio filtrado por lo que deben ser utilizados en conjunto con otros fármacos con el fin de evitar los efectos de hipopotasemia que estos producen. En este grupo se encuentran: espironolactona, amilorida entre otros (Fernández, 2015, p.25).

- ❖ **Inhibidores de la anhidrasa carbónica:** Estos diuréticos actúan a nivel del túbulo contorneado distal facilitando la eliminación del anión bicarbonato (Flórez, 2016, p.827).

- ❖ **Agentes osmóticos:** En este grupo se encuentra el manitol y la urea, sustancias que en solución son muy hipertónicas, se reabsorben escasamente por los túbulos provocando una presión osmótica y retienen agua, también interfieren con la reabsorción de sodio y cloruro. Actúan en varios segmentos de la nefrona siendo el principal sitio el asa de Henle y el túbulo proximal, son usados en casos de envenenamiento ya que aumentan la excreción del agente envenenador (Lüllmann et al., 2010:p.159).

1.1.3. *Hipertensión Arterial*

La Hipertensión Arterial es la fuerza que ejerce la sangre que circula contra las paredes de las arterias. La OMS y el Comité de Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión de EE,UU, (CDETH) manejan como cifras de presión arterial normal las menores de 90 mmHg como diastólica y valores inferiores de 140 mmHg en lo referente a la sistólica, la cual varía según la edad, el sexo y el grupo socio-racial . Se considera Hipertensión Arterial (HA) a valores por arriba de los mencionados registrados por lo menos dos valoraciones en días diferentes. Las causas son: obesidad, uso y abuso de sal, herencia, consumo de cigarrillos y sedentarismo (Model, 2016b: p.2).

Diuréticos más usados en la Hipertensión Arterial

Los fármacos tiazídicos son los diuréticos más utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial debido a su bajo costo, eficacia y tolerabilidad, estos medicamentos al ser administrados en altas dosis generan efectos adversos y no producen efectos antihipertensivos es por ello que actualmente se recomienda utilizar dosis bajas (Model, 2016b: p.2).

1.1.4. *Electrolitos potasio, sodio, cloro y calcio*

El K⁺ tiene la función de la excitabilidad neuromuscular, además de provocar cambios por aumento o por defecto de sus valores sanguíneos induciendo a trastornos graves de la conductibilidad y contractibilidad cardiaca (Ayus y Caramelo, 2006: p.94).

El Na⁺ otorga un 80% de la concentración osmolar, presente en el líquido extracelular cuya función es aseverar y conservar el volumen del líquido extracelular está presente en la sal y en otros alimentos como: enlatados, hot dogs, comida congelada etc., provoca el incremento de la

presión arterial por esta razón se debe evitar el consumo de alimentos que tengan un elevado nivel de Na^+ . Si los riñones eliminan el exceso de sales de Na^+ con pérdida simultánea de agua, se generaría una rápida disminución de volumen del líquido extracelular, y a la inversa, la excesiva reabsorción de sales de Na^+ y agua llevaría rápidamente a un incontrolable edema (Wilkins, 2007, p.229).

El Cl^- es un electrolito importante que ayuda a que el metabolismo del cuerpo funcione correctamente. Los riñones controlan los niveles de cloruro en la sangre. Por lo tanto, cuando hay un trastorno en los niveles de cloruro en la sangre, a menudo guarda relación con los riñones. El cloruro ayuda a mantener el equilibrio ácido-base del cuerpo (Avendaño y Hernando, 2008: p.72).

El Ca^{+2} es un electrolito que al ser filtrado en el glomérulo se reabsorbe a lo largo del túbulo renal, excepto en el segmento contorneado distal (Ayus y Caramelo, 2006: p.279).

1.1.5. Plantas medicinales como diuréticos

Existe una gran variedad de especies vegetales que contiene principios activos que favorecen la acción diurética siendo cuantitativamente inferiores a la de los diuréticos de síntesis, aunque aún no es clara la contribución de cada uno de ellos. Entre estos se encuentran los saponósidos, bases xantínicas, flavonoides, glúcidos y sales de potasio (Roger, 2006, p.269).

- Plantas con saponósidos: poseen propiedades tensioactivas que permiten el incremento de la permeabilidad de la membrana filtrante glomerular.
- Plantas con flavonoides: afecta a la permeabilidad de la membrana celular e inhiben a la fosfatasa renal.
- Plantas con bases xánticas: específicas en el edema cardíaco
- Plantas con glúcidos: permiten el incremento de la diuresis por mecanismos osmóticos (manitol) y otros actúan como natriuréticos inhibiendo la reabsorción activa de Na^+ en el túbulo proximal.
- Plantas con sales de potasio: provocan un efecto diurético gracias a un proceso osmótico (Pérez et al., 2011: p.215).

1.1.5.1. *Indicaciones de las plantas medicinales como diuréticos*

Las plantas diuréticas están recomendadas en afecciones bacterianas como inflamaciones de la pelvis renal y de las vías urinarias bajas. En estos casos se recurre a la mencionada terapia de lavado, que consiste en obligar la diuresis aumentando la excreción de agua lo que conlleva a la administración por vía oral de cantidades elevadas de líquido. Es importante tener en cuenta que en el caso de los edemas causados por insuficiencia cardíaca o renal, no deben realizarse tratamientos basados en la terapia de lavado (Roger, 2006, p.15).

En cuanto al tratamiento de arenillas y cálculos urinarios es recomendable usar preparados en forma de infusión, pudiendo llegar hasta volúmenes de dos litros por día. (Roldan, 1997, p.13).

1.2.5 *Familia Piperaceae*

Desde la antigüedad se le conoce como una de las familias más grandes e importantes están localizadas en los trópicos húmedos y cálidos de todo el mundo, contienen metabolitos secundarios como los fenilpropanoides (lignanos y neolignanos), amidas alifáticas y aromáticas, alcaloides, policétidos entre otros (Heinrich, 2015, pp.20-21). Esta familia está constituida por los siguientes géneros: *Piper*, *Peperomia*, *Trianaeopiper*, *Ottonia*, *Arctotonia*, *Macropiper*, *Manekia*, *Phothomorphea*, *Sarccorhachis*, *Verhuellia*, y *Zippeli* (Vásquez, 2015, p.36).

Género *Piper*

El género *Piper* es el más representativo de la familia Piperaceae está comprendido por más de 700 especies, son arbustos que pueden llegar a ser leñosos o a veces trepadores, sus tallos comúnmente presentan nudos gruesos, sus hojas son enteras que pueden ser: simples, onduladas y alternas con la presencia de inflorescencias en forma de amento (Novaes, 2014a; Duke, 2018)

El género *Piper* se caracteriza por tener en su constitución una amplia gama de metabolitos secundarios como: flavonoides, amidas, lignanos, neolignanos, taninos, saponinas, glicósidos, terpenoides y otros compuestos fenólicos que se encuentran presentes en las hojas, corteza del tallo, semillas y raíz (Novaes, 2014a: p.523). Debido a la presencia de los compuestos mencionados anteriormente esta especie es reconocida por poseer propiedades biológicas y farmacológicas como: antibióticas, antifúngicas, anticancerosas, insecticidas antiinflamatorias, antimutágenas y antimicrobianas (Vásquez, 2015, p.35).

1.2.5.2 *Piper peltatum* L.

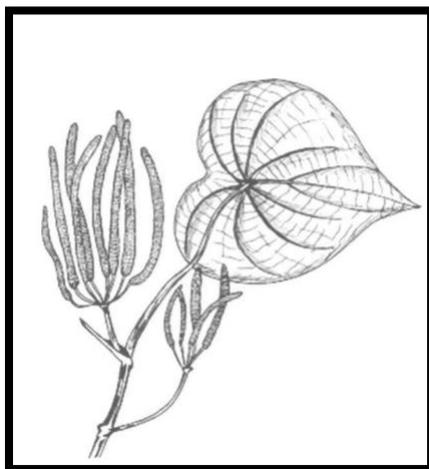


Figura 2-1: *Piper peltatum* L.

Fuente: (Vásquez, 2015, p.34)

La especie *Piper peltatum* L. es conocida también como ``cordoncillo`` o ``Santa María``, crece en lugares tapados de maleza y tiene varias aplicaciones terapéuticas como: diurético, antipirético y como agente antiinflamatorio, es utilizada en algunas regiones de la Amazonía boliviana y peruana (Duke, 2018, p.78).

1.2.5.3 *Descripción botánica de Piper peltatum*

Es una especie herbácea, considerada también como un sub- arbusto, que puede llegar a medir hasta 2 metros de altura (Vásquez, 2015, p.35). En el tallo se puede observar la presencia de nodos, sus hojas pueden ser cordadas, redondeadas, peltadas y de color verde pálido, pueden llegar a medir entre 20-40 cm de longitud, con apariencia membranosa y glandular. Las inflorescencias tienen la particularidad de encontrarse como espigas de color blanco, organizadas a manera de umbela entre 4mm de grosor y 5 a 10 cm de largo, y el fruto es sub-globuloso con un tamaño aproximado de 0.5 a 0.8 mm (Duke, 2018, p.78).

1.2.5.4 *Sinónimos de Piper peltatum*

Los principales sinónimos de esta especie son: *Lepianthes peltata* (L.) Raf. ; *Pothomorphe peltata* (L.) Miq (Duke, 2018, p.78).

1.2.5.5

Clasificación taxonómica de *Piper peltatum*

Tabla 1-1. Clasificación Taxonómica de *Piper peltatum* L.

TAXONOMÍA	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Piperales
Familia:	Piperaceae
Género:	<i>Piper</i>
Especie:	<i>P. peltatum</i> L.

Fuente: (Novaes, 2014a: p.524)

Realizado por: Belén Moyano

1.2.5.6 Hábitat y distribución de *Piper peltatum*

Hábitat

Esta especie comúnmente se encuentra en los sotobosques de lugares húmedos, o en matorrales de tierras bajas húmedas, principalmente en regiones tropicales. Es nativa de México, Centro América, las Antillas y Sudamérica (Duke, 2018, p.78).

Distribución

En Sudamérica se encuentra distribuida en 5 áreas: la Costa Pacífica de Colombia y Ecuador, el oeste de la Amazonía del Perú y Ecuador, la Costa atlántica del Brasil y los Andes de Venezuela (Novaes, 2014a: p.524).

Este género está ampliamente distribuido en el Ecuador aunque se desconoce el número de especies representadas, se han registrado 43 especies sobre 2400 m.s.n.m, Colombia es uno de los países con mayor distribución de especies pertenecientes a este género, en la región Andina, especialmente en los bosques húmedos y tropicales y el norte del Perú, al sur de México y la península de Yucatán también se pueden encontrar especies de este género (Beltrán, 2013, p.13).

La especie *Piper peltatum* L. tiene diferentes aplicaciones terapéuticas ya que es utilizada en algunas regiones de la Amazonía boliviana y peruana como: diurético, antipirético y antiinflamatorio mientras que en varias tribus colombianas esta especie es utilizada como abortivos, vermífugos, curar hinchazones, picaduras de serpientes y como anestésico local (Vásquez, 2015; López, 2017). En la medicina tradicional brasileña se utiliza en el tratamiento de patologías hepáticas, inflamatorias e infecciosas, antiinflamatorios, colago, colerético, diurético, vermífugo, anti-VIH, antioxidante, antigonorreico y antipalúdico (Heinrich, 2015; Moraes et al., 2004; Araújo et al., 2013). El modo de preparación de las hojas es a través de la maceración en agua para el tratamiento de las cefaleas y fiebre; su cocción para el tratamiento de odontalgias y su calentamiento y aplicación en el cordón umbilical para expulsar la placenta luego del parto, por otra parte se realiza la cocción de la raíz la cual es empleada como diurético, estimulante del sistema linfático, del hígado y del bazo y útil contra el infarto de las vísceras abdominales, antiemético y también se preparan infusiones para el tratamiento de la malaria en la región amazónica y otras partes de Sudamérica (López, 2017, p.216). En cuanto a la parte interna esta especie de *Piper* puede usarse para tratar úlceras o quemaduras en la piel.

La especie *Piper peltatum* contiene varios tipos de metabolitos secundarios, siendo la piperina (una piperamida) uno de los compuestos más representativos fitoquímicamente (Novaes, 2014a: pp.523-528).

También aislaron y caracterizaron un gran número de compuestos químicos como amidas, lignanos, neolignanos, hidroquinonas, alcaloides (pirrolidinas y piperidinas), terpenos, compuestos oxigenados, y derivados del ácido benzoico (Vásquez, 2015, p.35). Además, presenta un contenido considerable de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas (Kato y Furlan, 2007:pp.529-538).

En un estudio se determinó que el aceite esencial de las hojas de *Piper peltatum* L., está compuesto por: beta-cariofileno, germacreno D, alfa-humuleno, (E) nerolidol y óxido de cariofileno (Luz et al., 2000:pp.94-96). Otro componente de esta especie vegetal con un alto potencial farmacológico es el 4- nerolidilcatecol (4NC) presente en las raíces, hojas e inflorescencias. También, se aisló en la raíz de *Piper peltatum* nuevos compuestos derivados del catecol con propiedades antivirales denominados peltatol A, B y C (Moraes et al., 2004; Gustafson et al., 1992).

1.2.5.9 *Actividad farmacológica y biológica*

Con respecto a la actividad farmacológica, se encontró que la raíz tiene actividad contra el VIH debido a la presencia del peltatol A, B, C, el cual es capaz de inhibir la muerte celular inducida por VIH-1 a concentraciones sub-citotóxicas entre 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gustafson et al., 1992: pp.2809-2811).

En el extracto metanólico de *Piper peltatum* L., se pudo aislar al 4- nerolidilcatecol (4NC) mediante el fraccionamiento cromatográfico, el cual presenta una actividad inhibitoria contra tumores inducidos por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* causante de la enfermedad "corona de agallas", afectando a más de 80 familias de plantas herbáceas y forestales a nivel mundial (Mongelli et al., 1999: pp. 376-378).

Otro estudio el extracto metanólico de esta especie demostró una actividad antioxidante con un IC_{50} entre 5.0 y 57.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, también, se valoró la actividad antioxidante de esta especie con diferentes extractos mediante el método de quimioluminiscencia, determinando que el extracto metanólico tenía la mayor actividad antioxidante, con una $\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{g}/\text{mL}$. Además, en un artículo científico se evaluó la actividad de reducción del daño oxidativo del ADN, demostrando que el extracto metanólico posee la mayor actividad con una $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{g}/\text{mL}$, siendo altamente efectivo para disminuir el daño del ADN (Desmarchelier et al., 1997: pp. 288-296).

En otro estudio los extractos etanólicos de *P. peltatum* presentaron una baja actividad antiparasitaria en ratones con malaria, tratados por vía oral a 500 mg/kg y por vía subcutánea a 20, 100 y 500 mg/kg de extracto (Zuany et al., 1988: pp. 101-106).

Además, el extracto metanólico de *P. peltatum* presenta actividad larvicida *in vitro* contra *Aedes aegypti* (vector de la fiebre del dengue hemorrágico) en una concentración letal media (LC_{50}) de 398 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Mongelli et al., 1999: pp. 71-72).

1.2.6 **Experimentación en animales de laboratorio**

Desde los principios de la Biología, la utilización de animales como reactivos biológicos en el ámbito de la investigación científica ha sido fundamental para el establecimiento de nuevos postulados y la constante validación de los mismos. Es así, como el desarrollo científico en las áreas biomédicas, se relaciona con el nivel de desarrollo de la tecnología y experimentación animal (Domínguez, 1997, pp. 6-7).

Un proceso con animales de experimentación empieza con la preparación del animal para su uso y termina cuando se finalizan las observaciones sobre el mismo. Los animales como reactivos biológicos en la investigación científica han aportado numerosos beneficios. El uso de estos animales juega un papel importante para la humanidad y está resumida por el *National Research Council* (EEUU). De hecho, en los últimos tiempos estos estudios han contribuido de manera directa a incrementar la esperanza de vida de las personas, ya sea en la producción y validación de vacunas, como en el estudio de nuevas enfermedades (Domínguez, 1997, pp. 6-7).

Para el desarrollo de fármacos los animales de experimentación son importantes ya que los datos obtenidos en ellos pueden ser extrapolables a humanos. En la mayoría de fármacos nuevos, es necesario seguir estrategias con fundamento científico. Por tanto, se realizan muchos esfuerzos en la elección de los sistemas de verificación (Hernández, 2006, p.252).

La elección de una especie animal se fundamenta en las similitudes entre una especie animal y los humanos en aspectos como:

- Farmacodinámica
- Farmacocinética
- Fisiología (Hernández, 2006, p.253)

Es necesario mantener el buen trato de las especies animales durante todo el proceso de investigación, de acuerdo a las legislaciones sobre el manejo y uso de animales de laboratorio. Es importante conocer todas las restricciones ambientales y de movimiento, privación de agua y alimento, administración de drogas, preparaciones crónicas y otras más, para así salvaguardar la integridad de las especies usadas (Domínguez, 1997, p.7).

1.2.6.1 *Rattus norvegicus*



Figura 3-1: *Rattus norvegicus*

Fuente: (Hau y Schapiro 2010)

Rattus norvegicus son consideradas como especies numerosas, por lo que se utilizan como animales de experimentación son de pelaje grueso y áspero con orejas prominentes y cola sin pelaje prácticamente desnuda; la cola es más corta en comparación con el cuerpo. En promedio estas llegan a medir 400 mm haciendo referencia que la medida es de nariz a cola y su peso varía entre 140 hasta 500 g. Las hembras son generalmente más pequeñas que los machos, presentan en las partes superiores una coloración café, con pelos negros alternados y en el vientre un color más claro, existen varias cepas que se crían en los bioterios las cuales pueden ser de color blanco, marrón o negro (IUCN ,2016, p.142).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA:

Tabla 2-1: Información taxonómica de *Rattus Norvegicus*

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Rodentia
Familia	Muridae
Nombre científico	<i>Rattus norvegicus</i>
Nombre común	Rata noruega

Fuente: (IUCN ,2016, p.142)

Realizado por: Belén Moyano

1.2.6.2 Volúmenes de dosificación para diferentes vías de administración

La dosificación del animal de experimentación debe tener exactitud, precisión y ser la más apta para cuidar su bienestar, ya que volúmenes elevados podrían restringir la validez científica por reacciones a nivel fisiológico o dañar el bienestar de los animales de experimentación (Diehl et al., 2001: p.16).

En la planificación de un protocolo de dosificación se debe considerar la frecuencia de dosificación, volumen, pH y el vehículo (acuoso u oleoso). Los animales no son anestesiados antes de la dosificación, porque el mantenimiento de los reflejos de la mordaza son importantes para detectar la posición apropiada de la cánula y disminuir las posibilidades de reflujo y aspiración después de la dosificación (Hernández, 2006b: p.254).

La siguiente tabla muestra los volúmenes de administración para las vías comúnmente empleadas en las especies más frecuentemente utilizadas:

Especie	Subcutánea		Intraperitoneal		Intramuscular		Oral	
	Calibre de aguja	Volumen (mL)	Calibre de aguja	Volumen (mL)	Calibre de aguja	Volumen (mL)	Calibre de aguja	Volumen (mL)
Ratón 25 g	25	0,25	25	0,5	27	0,05 por sitio	20	0,25
Rata 200 g	25	1	25	2	25	0,1 por sitio	18	2
Conejillo de indias 200 g	23	1	25	2	25	0,1 por sitio	18	2
Conejo 4 Kg	23	4	23	20	25	1	13 o 8	15
Cerdo 25 Kg	22	25	20	25	23	6,25	22	150

Figura 4-1: Calibre de aguja y volumen de dosificación recomendado para diferentes vías de administración

Fuente: (Hau y Schapiro ,2010,p.21)

1.2.6.3 Vías de administración

Intramuscular:

Se sujeta a la rata y se inocula en los miembros posteriores, introduciendo la aguja en forma paralela al fémur, las agujas utilizadas son las de calibre 25 y 27. En estudios de dosis múltiple los sitios de administración deben ser rotados además es necesario considerar la aparición de inflamación y secuelas (Diehl et al., 2001: pp.16-17).

Intraperitoneal:

Se basa en colocar el medicamento por vía abdominal la cual se divide en 4 secciones, la aplicación de la inyección se realiza inclinando al animal hacia el cráneo e introduciendo la aguja en un ángulo de 35° aproximadamente para no tocar las vísceras y causar peritonitis mortal (Diehl et al., 2001:pp.16-17)

Subcutánea:

Se extiende la piel del abdomen y se introduce la aguja, esta vía de administración es muy utilizada (Diehl et al., 2001: pp.16-17).

Intravenosa:

Las venas de la cola (son tres) se dilatan con un poco de agua caliente. Se localiza una de estas venas para realizar la administración. Para esta ruta debe distinguirse entre inyección en bolo, inyección intravenosa lenta o infusión intravenosa (Diehl et al., 2001: pp. 16-17).

Vía oral:

Se sujeta al animal en forma vertical, se coloca la sonda o cánula en la boca y se le introduce con movimientos suaves observando el movimiento de deglución del animal, se administra el volumen requerido y posteriormente se extrae con movimientos firmes y suaves (Diehl et al., 2001:pp.16-17).

En ocasiones, es necesario restringir la ingesta de alimentos de los animales antes de la dosificación debido a que puede afectar la absorción. Se ha demostrado que grandes volúmenes de dosis (40 mililitros por kilogramo) sobrecargan la capacidad del estómago y pasan inmediatamente al intestino delgado (Diehl et al., 2001:pp.16-17).

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de investigación

Los ensayos fueron realizados en los laboratorios de productos naturales, análisis instrumental y bioterio ubicados en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.

2.2 Recolección e identificación del material vegetal

La raíz de *Piper peltatum* fue recolectada en el cantón el Carmen, perteneciente a la provincia de Manabí para lo cual se tuvo que sacar permisos tanto de movilización como de investigación.

Para la identificación de la especie, se tomaron ejemplares de la planta completa y fueron llevados al herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato (AMAS) donde fueron identificados por el PhD. Jorsé Homero Vargas López

2.3 Materiales, equipos y reactivos

2.3.1 *Material vegetal*

Raíces de *Piper peltatum* L.

2.3.2 *Material biológico*

Ratas albinas hembras (*Rattus norvegicus*) las cuales pertenecen al bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.3.3 *Fármaco de referencia*

Se utilizó furosemida como control positivo comparativo en el ensayo para determinar la actividad diurética.

2.3.4 *Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados*

Tabla 1-2: Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados

Control de Calidad de la Materia Prima		
Materiales	Equipos	Reactivos
Embudo	Equipos	Ácido clorhídrico al 10%
Capsulas	Balanza analítica	Agua destilada
Pinzas para capsulas	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C	
Trípode	Molino Arthur H. Thomas C. O	
Desecador	Estufa Memmert SNB400	
Crisoles de porcelana	Sonicador	
Reverbero		
Papel filtro		
Vasos de Precipitación		
Tamizaje Fotoquímico		
Materiales	Equipos	Reactivos
Pipetas de 1 mL, 5 mL y 10 mL	Sorbona	Agua destilada
Tubos de ensayo		Alcohol amílico
Pinzas para tubos de ensayo		Ácido clorhídrico al 1%
Frasco Ámbar 500mL		Ácido clorhídrico concentrado

Gradilla		Ácido sulfúrico concentrado
Papel filtro		Anhídrido sulfúrico concentrado
		Cloruro de sodio
		Cloroformo
		Cinta de magnesio metálico
		Cloruro Férrico
		Carbonato de sodio
		Etanol
		Éter Etilico
		Reactivo de Dragendorff
		Reactivo de Wagner
		Reactivo de Borntrager
		Reactivo de FeCl ₃
		Reactivo de Catequinas
		Reactivo de Fehling A y B
		Reactivo de Baljet
		Hidróxido de sodio al 5%
Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico		
Materiales	Equipos	Reactivos
Frasco ámbar 500 mL	pH-metro	Etanol
Probeta 100 mL	Refractómetro	Agua destilada
Picnómetro	Estufa Memmert SNB400	
Vasos de Precipitación		
Capsulas de porcelana		
Pinzas para cápsulas		
Piseta		
Elaboración del Extracto Liofilizado		
Materiales	Equipos	Reactivos
Balones esmerilados 250 mL	Balanza analítica	Etanol
Espátula	Congelador	Agua destilada
Trípode	Bomba de presión al vacío	
Algodón higroscópico	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath	
Embudo simple	Sonicador Branson 2510	

Mangueras	Liofilizador Thermo MicroModulyo Dryer	
Papel filtro		
Frasco Ámbar 500 mL		
Cuantificación de Fenoles y Flavonoides		
Materiales	Equipos	Reactivos
Balones de aforo de 25 mL y 100 mL	Balanza analítica	Agua destilada
Pipeta de 5 mL y 10 mL	Vórtex mixer MRC S1-100	NaNO ₂ al 5 %
Micropipeta de 100 µL y 1000 µl	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolución 220	NaOH
Puntas amarillas y azules para Micropipeta		AlCl ₃ al 10 %
Piseta		Metanol
Vasos de Precipitación		
Papel aluminio		
Tubos de ensayo		
Cronometro		
Cuantificación de Antioxidantes		
Materiales	Equipos	Reactivos
Micropipeta de 100 µL	Balanza analítica	Metanol
Gradilla	Vórtex mixer MRC S1-100	Reactivo DPPH
Papel aluminio	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolución 220	Agua destilada
Balón aforado de 250 mL		
Tubos de ensayo		
Pipetas graduadas de 5 mL		
Determinación de la Actividad Diurética		
Materiales	Equipos	Reactivos
Equipo de Bioseguridad	Jaula Metabólica	Furosemida
Probetas de 10 ml	Balanza Analítica	Agua destilada
Jeringuillas de 3 mL		Carboximetilcelulosa Sódica
Algodón		
Espátula		
Varilla de agitación		
Balones de 10 mL y de 25 mL		

Papel aluminio		
Vasos de precipitación		
Pipetas de 5 mL y 10 mL		
Frascos ámbar		
Balón de aforo de 100 mL		
Liofilizado de la raíz de <i>Piper peltatum</i>		

Realizado por: Belén Moyano, 2018

2.4 Métodos y Técnicas

2.4.1 *Recolección, lavado y secado del material vegetal*

Para esta investigación se utilizaron raíces de *Piper peltatum* L., las cuales fueron secadas en la estufa a 120°C por 12 horas y trituradas hasta obtener pequeñas partículas entre 2 a 3 milímetros, denominándose material vegetal seco y triturado.

2.4.2 *Parámetros de control de calidad aplicados a la droga cruda*

Cada prueba fue realizada por triplicado con el propósito de garantizar la calidad de la droga utilizada (Normas Ramales. Drogas Crudas y Extractos y Tinturas. NRSP 309, 311 y 312. MINSAP 1992). Los ensayos realizados fueron los siguientes:

2.4.2.1 *Determinación del contenido de humedad*

El alto contenido de agua en la especie vegetal favorece al crecimiento de microorganismos, así como también la presencia de hongos e insectos promueven a su deterioro (Tsay et al., 2016:p.6)

Procedimiento:

En una cápsula de porcelana previamente tarada se pesó $2 \text{ g} \pm 0.5 \text{ mg}$ de droga cruda seca y molida, seguidamente se ubicó la cápsula dentro de la estufa 105°C por 3 horas. Luego se secó de la estufa y se colocó en un desecador a temperatura ambiente por unos 15 min aproximadamente, se pesó y nuevamente se llevó a la estufa, esta vez por una hora más. Se continuó el mismo procedimiento hasta que se obtuvo un peso constante (Heinrich, 2015, pp. 3-8).

Para el cálculo respectivo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

H= porcentaje de pérdida en peso por desecación.

M= masa de cápsula vacía.

M₁= masa de cápsula con la muestra de la droga desecada.

M₂= masa de la cápsula con la muestra de la droga.

2.4.2.2 *Determinación de cenizas totales*

Mediante este ensayo se puede determinar el contenido total de minerales en la muestra, siendo el residuo inorgánico que queda tras la eliminación de los compuestos orgánicos de la muestra seca.

Procedimiento:

En un crisol de porcelana previamente tarado se pesó 2 g ± 0.5 mg de droga seca y pulverizada, se carbonizó en un reverbero, posteriormente se colocó en una mufla a 700°C por 2 horas hasta su incineración total. Luego se enfrió el crisol en un desecador a temperatura ambiente y se pesó. Se repitió este proceso hasta que se obtuvo peso constante (Miranda, 2006, pp.38-64)

.

Para el cálculo respectivo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

C (%) = cenizas totales.

M (g) = masa de crisol vacío.

M₁ = masa del crisol con muestra del ensayo.

M₂ = masa de crisol con la ceniza.

2.4.2.3 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Este ensayo permite determinar la presencia de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico en la droga cruda.

Procedimiento:

En un crisol de porcelana se colocó las cenizas obtenidas con anterioridad, se adicionó 3ml de ácido clorhídrico 10 %, se calentó tapado con un vidrio reloj durante 10 minutos a baño maría, posteriormente con 5 ml de agua caliente se lavó el vidrio reloj junto con el sobrante del crisol. Luego se filtró y rápidamente se lavó el residuo con agua caliente, se colocó 2 gotas de nitrato de plata 0.1 M esto hasta que se observó que no hay presencia de cloruros en la solución. Después se llevó la solución a una estufa a 105°C por un tiempo, se transfirió al crisol y se colocó en la mufla a 700°C por 2 horas. Luego se trasladó al desecador por 15 minutos hasta que llegó a temperatura ambiente y se pesó hasta que se obtuvo masa constante (Miranda, 2006, pp.38-64).

Los resultados se realizaron con la siguiente fórmula:

$$\%B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

B= (%) cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M= masa del crisol vacío.

M₁= masa del crisol con la muestra de ensayo.

M₂= masa del crisol con la porción de cenizas de ácido clorhídrico.

2.4.2.4 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Esta prueba permite determinar la cantidad de material inorgánico presente en las cenizas totales.

Procedimiento:

En el crisol de cenizas totales ya obtenidas, se colocó 15 mL de agua, se cubrió con un vidrio reloj y se dejó en baño maría por 5min. Luego se filtró la solución, el papel filtro se ubicó en el interior del crisol hasta que se carbonizó por completo, se llevó nuevamente a la mufla por 2 horas a 700°C. Posteriormente se colocó el crisol en la estufa a 105°C por 15 min. Luego se llevó al desecador y se pesó hasta que se obtuvo una masa constante (Miranda, 2006, pp.38-64)

Los resultados se obtuvieron mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

Ca= (%) cenizas solubles en agua.

M₁ = masa crisol con la muestra del ensayo (g).

M₂ = masa crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

M = masa crisol vacío (g).

2.4.3 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico permite identificar de manera cualitativa los componentes principales de una planta mediante pruebas de precipitación y de coloración.

2.4.3.1 Elaboración de los extractos para el tamizaje fitoquímico.

Para la elaboración de los extractos para el tamizaje fitoquímico, se pesó 50 g de las raíces de *Piper peltatum* L y se añadió 250 mL de solvente. Los solventes se fueron colocando sobre la droga cruda de acuerdo a la polaridad creciente: hexano, etanol y agua. El procedimiento se realizó en base al esquema de la Figura 1-2:



Figura 1-2: Esquema para el Tamizaje Fitoquímico.

Fuente: (Miranda, 2006, pp.38-64)

En base al esquema de las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas se realizó los ensayos respectivos de los extractos hexánico (etéreo), alcohólico y acuoso. Se detalla a continuación en las figuras 2-2, 3-2 y 4-2:

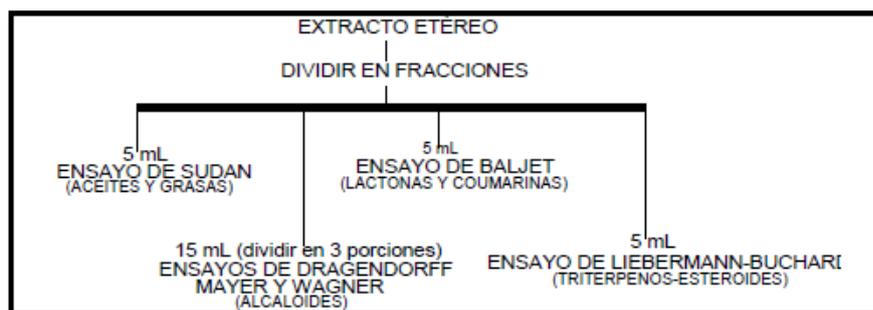


Figura 2-2: Esquema de ensayos fitoquímicos del extracto etéreo

Fuente: (Miranda, 2006, pp.38-64)

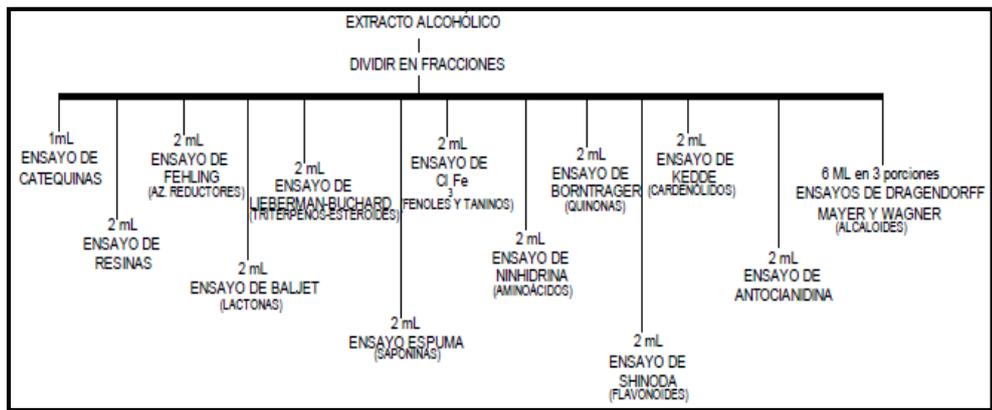


Figura 3-2: Esquema de ensayos fitoquímicos del extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006, pp 38-64)

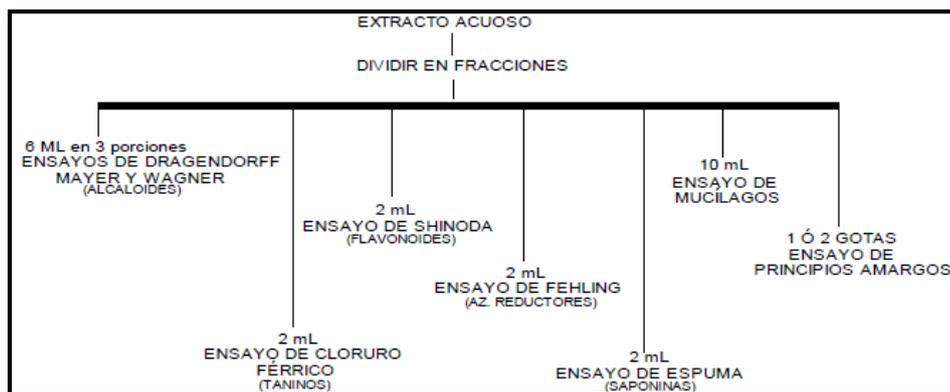


Figura 4-2: Esquema de ensayos fitoquímicos del extracto acuoso

Fuente: (Miranda, 2006, pp.38-64)

2.4.3.2 *Ensayo de Sudan*

Identifica compuestos grasos presentes en el extracto etéreo.

Procedimiento:

Se añadió 1 mL de reactivo de sudan III a la muestra del extracto etéreo y se evaporó el solvente en baño de agua.

Resultados positivos:

Presencia de una capa o gotas de color rojo en el sobrante del líquido o en las paredes del tubo.

2.4.3.3 *Ensayo de Dragendorff, Mayer, Wagner*

Estos ensayos permiten determinar la presencia de alcaloides en un extracto de forma cualitativa.

Procedimiento:

- Extracto hexánico: Se evaporó una muestra de extracto en baño maría y se volvió a disolver el restante en 1 ml de HCl al 1%.
- Extracto alcohólico y acuoso: se colocó 1 gota de HCl concentrado, se calentó con cuidado y luego se dejó enfriar hasta su acidificación.

Después de la acidificación de cada extracto:

- En Dragendorff: Se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff.
- En Mayer: Se colocó una pizca de cloruro de sodio se removió y filtró, luego se colocó 2 a 3 gotas de reactivo de Mayer.
- En Wagner: Se añadió 2 o 3 gotas del reactivo de Wagner.

Resultados positivos:

- Opalescencia: (+)
- Turbidez: (++)
- Precipitado: (+++)

2.4.3.4 *Ensayo de Baljet*

Permite identificar compuestos con agrupamiento lactónico, principalmente cumarinas y otros compuestos pertenecientes a este grupo.

Procedimiento:

Se evaporó en baño maría los extractos no alcohólicos, se disolvieron en 1 mL de alcohol y luego se añadió 1 mL de reactivo

Resultado positivo:

- Precipitado rojo (++)
- Coloración roja (+++)

2.4.3.5 *Ensayo de Borntrager*

Este ensayo identifica la presencia de quinonas en el extracto.

Procedimiento:

- Alícuota del Extracto sin cloroformo: se evaporó el solvente y al residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo.
- Se añadió 1 mL de NaOH al 5%
- Se agitó rápidamente hasta llegar a una mezcla homogénea de las fases.
- Se dejó en reposo hasta su completa separación.

Resultado positivo:

Fase acuosa alcalina (superior)

- Color rosado o rojo: (positivo).
- Coloración rosada: (++)
- Coloración roja: (+++)

2.4.3.6 *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Permite identificar la presencia de triterpenos y/o esteroides en un extracto.

Procedimiento:

- Muestra del extracto sin cloroformo: se evaporó el solvente en baño de agua.
- El restante se volvió a disolver en 1 mL de cloroformo.
- Seguidamente se añadió 1 ml de anhídrido acético y se mezcló.
- Cuidadosamente por las paredes del tubo se dejó caer de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Resultado positivo:

- Rosado azul (muy rápido): (+)
- Verde intenso (visible rápidamente): (++)
- Verde oscuro-negro (final de la reacción): (+++)

Se puede diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras provocan la coloración azul o azul verdoso, mientras que las segundas inducen el rojo, rosado o púrpura

2.4.3.7 *Ensayo de catequinas*

Permite observar la presencia de catequinas en el extracto.

Procedimiento:

- Con la ayuda de un capilar se tomó una gota de muestra de extracto y se aplicó sobre un papel filtro.
- Se aplicó sobre la mancha solución de carbonato de sodio.

Resultados positivos:

Visualización de una mancha color carmelita verde ante la luz UV.

2.4.3.8 *Ensayo de resinas*

Este ensayo detecta la presencia de resinas.

Procedimiento:

Rápidamente se añadió 2 ml de solución alcohólica y 10 ml de agua destilada.

Resultados positivos:

Presencia de un precipitado

2.4.3.9 *Ensayo de Fehling*

Este ensayo permite determinar la presencia de azúcares reductores en un extracto.

Procedimiento:

- Alícuota del extracto sin agua: se evaporó el solvente en baño maría.
- Al residuo se le disolvió 1.2 mL de agua.
- Luego se adicionó 2 mL del reactivo de Fehling y se calentó en baño maría durante 5-10 minutos.

Resultados positivos:

- Color rojo
- Precipitado rojo

2.4.3.10 *Ensayo de la espuma*

Permite reconocer saponinas de tipo esterooidal como triterpénica en un extracto.

Procedimiento:

- Muestra en alcohol: se diluyó con 5 veces su volumen de agua.
- Se procedió a agitar fuertemente la mezcla durante 5-10 minutos seguidos.

Resultados positivos:

Presencia de espuma con más de 2mm, visible en la parte superior del líquido por un tiempo de 2 minutos.

2.4.3.11 *Ensayo del cloruro férrico*

Permite visualizar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto.

Procedimiento:

- Extracto alcohólico: se adicionó 3 gotas de tricloruro férrico 5% en solución salina.
- Extracto acuoso (fundamentalmente para taninos): se añadió acetato de sodio y 3 gotas de tricloruro férrico 5% en solución salina.

Resultados positivos cuando:

- Coloración rojo-vino: compuestos fenólicos en general.
- Coloración verde intensa: taninos tipo pirocatecólicos.
- Coloración azul: taninos de tipo pirogalotánicos.

2.4.3.12 *Ensayo de Shinoda*

Permite determinar en un extracto la presencia de flavonoides.

Procedimiento:

- La muestra del extracto se diluyó en 1 mL de HCl concentrado.
- Luego se colocó un pedazo de cinta de magnesio metálico.
- Se esperó 5 minutos después de la reacción.
- Se adicionó a la mezcla 1 ml de alcohol amílico.
- Finalmente se mezclaron bien las dos fases y se dejó reposar hasta que las fases se vuelvan a separar por completo.

Resultado:

Positivo cuando la coloración puede ser: amarilla, naranja, carmelita o rojo intensos en el alcohol amílico.

2.4.3.13 Ensayo de antocianidinas

En los extractos evidenciar la presencia de estructuras de secuencia del grupo de flavonoides.

Procedimiento:

Extracto etanólico

- Se colocó 1 mL de HCl concentrado en los 2 ml del extracto se calentó durante 10 min
- Se dejó enfriar y añadió 1 mL de agua con 2 mL de alcohol amílico.
- Luego se agitó y se dejó reposar hasta que se separaron las fases.

Resultados:

Positivo cuando da una coloración roja a marrón (fase amílica).

2.4.3.14 Ensayo de mucílagos

Permite reconocer la presencia estructuras tipo polisacáridos en los extractos, los mismos que tienen la capacidad de formar un coloide hidrófilo con un elevado índice de masa que hace que aumente la densidad del agua donde va hacer extraído.

Procedimiento: Se enfrió una muestra del extracto a una temperatura de 0-5°C.

Resultados:

El ensayo es positivo cuando la muestra tomada del extracto tiene una consistencia gelatinosa

2.4.3.15 *Ensayo de principios amargos y astringentes*

Para la realización de este ensayo se tomó 1 gota de extracto acuoso, se probó y reconoció el sabor de cada principio.

2.4.4 *Control de calidad del extracto alcohólico*

2.4.4.1 *Requisitos organolépticos*

Permite determinar el olor, color, sabor y aspecto que presenta el extracto alcohólico de la droga cruda.

2.4.4.2 *Determinación de densidad relativa*

La densidad se realizó con la ayuda de un picnómetro, se procedió a obtener los pesos del picnómetro para el cálculo, primero se llenó con la muestra del extracto conservado a 25°C por 15 minutos y se pesó. Después se secó el picnómetro y se pesó vacío. Finalmente se llenó con agua destilada a 25°C (Miranda, 2006, P.38-64).

.

El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M= Peso del picnómetro vacío.

M₁= Peso del picnómetro con muestra del extracto.

M₂= Peso del picnómetro con agua.

2.4.4.3 *Índice de refracción*

Este ensayo se realizó en un refractómetro, se colocó una gota de la muestra del extracto sobre el prisma y por medio del espejo del instrumento se enfocó la luz que incidió sobre sobre la entrada del prisma.

2.4.4.4 *Medición de pH*

Para la medición del pH se utilizó un pHmetro digital.

2.4.4.5 *Determinación de sólidos totales*

Para la realización de este ensayo se colocó en una cápsula previamente tarada una alícuota de 5ml de extracto hidroalcohólico y se evaporó en baño maría. Posteriormente se ubicó la cápsula dentro de la estufa a 105°C por 3 horas. Luego se llevó al desecador hasta temperatura ambiente y se tomó el peso hasta que se mantuvo constante (Miranda, 2006, P.38-64)

Los resultados se obtuvieron en base a la siguiente fórmula:

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

Donde:

ST= sólidos totales de la muestra.

P= masa de la cápsula vacía (tarada).

Pr= masa de la cápsula con el residuo.

V= volumen de la alícuota del ensayo.

2.4.5 Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum* L.

Para preparar el extracto hidroalcohólico, se pesó 100 g de droga cruda de *Piper peltatum* L. y se colocó en un frasco ámbar con 1000 mL de solvente (etanol al 70%) y se dejó macerar por 72 horas con agitaciones por pequeños lapsos de tiempo. Transcurrido el tiempo de maceración, se llevó el extracto al sonicador durante 2 horas. Consecutivamente se procedió a filtrar el extracto y se concentró en el rotavapor a 55°C como resultado se obtuvo una solución a la cual se filtró. Por último el extracto filtrado se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó hasta que el extracto quedo libre de agua (Miranda, 2006, pp.38-64).

2.4.6 Determinación de Flavonoides Totales

Para cuantificar los flavonoides totales se usó tricloruro de aluminio y se midió por espectrofotometría. Se prepararon soluciones estándar de quercetina usando como disolvente metanol a concentraciones de 20, 40, 60,80, y 100 ppm con el fin de obtener una curva de calibración (Tomás-Barbera et al., 2001: pp 4748-4760).

Procedimiento:

Se colocó 1 mL de las soluciones patrones o las muestras en alcohol al 70% en un tubo de ensayo y se le añadió 4 ml de agua destilada y 0.3 ml de nitrito de sodio al 5%. Se esperó por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 0.3 ml de tricloruro de aluminio al 10%, se vortericizó y se dejó durante 5 minutos en completa oscuridad. Luego se añadió 2 ml de NaOH 1M y se homogenizó la solución. Finalmente, las lecturas se realizaron a 510 nm en un espectrofotómetro

2.4.7 Determinación de Fenoles Totales Mediante el Método de Folin-Ciocalteu

Se preparó una solución estándar de ácido gálico a las concentraciones de 20, 40, 60,80 y 100 ppm, con el fin de obtener una curva de calibración necesaria que permita cuantificar la concentración de fenoles totales en el extracto.

Procedimiento:

Se procedió a tomar 250 ($\mu\text{g/mL}$) de solución estándar la cual fue colocada en un balón de aforo de 25 mL, seguidamente se adicionó 15 mL de agua destilada y 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se homogenizó y se dejó en reposo por 8 minutos, luego se adicionaron 3,75 mL de carbonato de sodio al 7.5% y se aforó a un volumen final de 25 mL con agua destilada. Se vortericizó por 1 minuto y se dejó por 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad completa. Se realizaron las lecturas a una medición de 765 nm y se trazó la curva de calibración en función de la concentración vs la absorbancia (Heinrich, 2015, pp. 3-8).

2.4.8 Determinación del potencial antioxidante de raíces de *Piper peltatum* L. por el método DPPH.

Para elaborar la curva de calibración se preparó disoluciones de ácido gálico utilizando como disolvente metanol a diferentes concentraciones: 10, 50, 100, 200,500 y 1000 ppm.

Procedimiento:

Se tomó 3.9 mL de reactivo de DPPH (1,1 -diphenyl-2-picrylhydrazyl) y se añadió 100 µL de solución de ácido gálico o del extracto respectivamente y se dejó en obscuridad durante 1 hora, posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 515 nm.

Los radicales libres inhibidos DPPH (I%), se calculó mediante el autor Tohidi y col

$$\% = \frac{\text{ABS CONTROL} - \text{ABS MUESTRA}}{\text{ABS CONTROL}} \times 100$$

Donde:

1%=porcentaje de los radicales libres inhibidos.

ABS CONTROL= absorbancia de la muestra control

ABS MUESTRA = absorbancia del extracto de *Piper peltatum*.

V= volumen de la alícuota del ensayo preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum* L.

2.5.8 Evaluación de la actividad diurética de las raíces de *Piper peltatum* L.

2.5.8.1 Preparación del extracto del material vegetal y la dosis de furosemida:

Se preparó una solución madre de 55 mg/mL utilizando como disolvente carboximetilcelulosa sódica al 0.9%, a partir de esta se procedió a formular las disoluciones para los diferentes tratamientos: 25, 100 y 200 mg/kg.

Como grupo control negativo se utilizó carboximetilcelulosa sódica al 0.9%

Como grupo control positivo se utilizó furosemida sólido oral de 40 mg, a una dosis de 10 mg/kg disuelta en carboximetilcelulosa sódica 0,9% (Al-saikhan and Ansari, 2016, p.2).

2.5.8.2 Animales experimentales:

Se utilizó ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*) hembras, de pesos comprendidos entre 160 a 240 g provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias y mantenidas a las especificaciones que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2-2: Condiciones en las que se mantuvieron los animales de experimentación

Temperatura	22 ± 2 °C
Humedad	50 ± 10 %
Período de fotoluminiscencia	12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
Alimentación	Pellets de balanceado para cuy 25 g al día y agua purificada.

Realizado por: Belén Moyano, 2018

2.5.8.3 Protocolo experimental para determinar la actividad diurética

La actividad diurética se determinó con el método de Lipschitz con ligera modificación la cual consiste en dividir a las 25 ratas en 5 grupos totalmente al azar y privarles de alimento pero no de agua 12 horas antes de la prueba, luego a cada una se administró oralmente 5 ml/ 100 g de peso corporal de solución salina isotónica ($\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ 0.9% p/v), la cual fue necesaria para causar un tolerable grado de diuresis al simular condiciones edematosas para así poder demostrar su efectividad en presencia de agua y electrolitos (Nedi et al., 2004: p.60).

Cuarenta y cinco minutos después a cada grupo se le realizó la siguiente administración: grupo 1: 1 mL de carboximetilcelulosa sódica al 0,9%; grupo 2: 1 ml de furosemida (10 mg/kg); grupo 3,4 y 5 : 1 ml de extracto liofilizado de la raíz de *Piper peltatum* L., a concentraciones de (25, 100 y 200 mg/kg), luego se ubicó en jaulas metabólicas para realizar la recolección de orina durante un periodo de 6 horas, posteriormente se midió el volumen final de orina excretada en mL y finalmente se procedió a medir la concentración de electrolitos (Kau et al., 1984; Lipschitz et al.,1943).

2.5.9 Determinación de electrolitos en orina

La medición de electrolitos se realizó con el analizador versátil ERBA LYTE del laboratorio clínico EL CISNE-Riobamba.

Cuenta con electrodos intercambiables, los cuales permiten configurar el equipo en 7 perfiles diferentes.

Método: por electrodo de ion selectivo.

Análisis: se levanta la puerta para que la muestra sea automáticamente aspirada.

Volumen de muestra: 150 μ L tipo de muestra: orina

Tiempo de análisis: 50 segundos

Temperatura: 15-32°C

Humedad relativa: 5%-95%

2.5.10 Análisis estadístico:

Los datos de esta investigación se tabularon en el sistema estadístico Minitab 18 y Excel. Los resultados fueron analizados mediante el test de ANOVA y un post test Dunnet según los requerimientos. Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si $p < 0,05$.

CAPÍTULO III

3 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de la Droga Cruda

El control de calidad realizado a una droga cruda es importante ya que sirve para determinar que se encuentre libre de contaminación como: polvo, defecación de animales e insectos.

Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de la raíz de *Piper peltatum* L.

Parámetro	Raíz de <i>Piper peltatum</i> L.	Límites de referencia	Normativa
Humedad	7.30 %±0.12	< 14 %	USP# 35
Cenizas Totales	9.32%±0.14	< 12 %	USP# 35
Cenizas Solubles en H ₂ O	5.20 %±0.06	< 7 %	USP# 35
Cenizas insolubles en HCl	3.30%±0.16	< 5 %	USP#35

Realizado por: Belén Moyano, 2018

En la Tabla 1-3, se observa que el contenido de humedad de la droga cruda fue 7.30%±0.12 encontrándose dentro de los parámetros establecidos por la USP # 35, lo cual es fundamental para mantener la estabilidad e impedir el crecimiento microbiano, la aparición de insectos y hongos. Además constituye un parámetro importante para garantizar la calidad de la droga vegetal.

El alto contenido de cenizas totales indica la presencia de compuestos orgánicos e inorgánicos como: fosfatos, carbonatos, cloruros, calcio etc. Estos compuestos pueden provenir tanto de la ceniza fisiológica que se deriva del propio tejido vegetal, como de la ceniza no fisiológica que constituye la materia extraña como arena o tierra que se adhiere a la superficie de la planta, por otro lado el contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico permite determinar si la droga cruda contiene sustancias minerales como arena o sílice mientras que el ensayo de cenizas solubles en agua permite determinar la cantidad de sales solubles en agua (Kunle, 2012, pp.102-103).

Las raíces de *Piper peltatum* presentaron $9.32\% \pm 0.14$ de cenizas totales, $5.20\% \pm 0.06$ de cenizas solubles en agua y $3.30\% \pm 0.16$ de cenizas insolubles en ácido clorhídrico encontrándose dentro de los valores establecidos por la USP#35, garantizando la calidad de la droga vegetal para la realización de ensayos posteriores debido a la ausencia de materia extraña como tierra, arena o sílice. (REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA, 2003, p.95)

3.2 Tamizaje Fitoquímico

Tabla 2-3: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso.

Determinación de metabolitos	Indicadores	Tipo de Extracto		
		ÉTEREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
SUDAN (Aceites – grasas)	Coloración roja (+)	(+)		
BALJET (Lactonas – cumarinas)	Rojo (++) Precipitado rojo (+++)	(++)	(++)	
DRAGENDORFF (Alcaloides)	Opalescencia (+)	(-)	(+)	(+)
WAGNER (Alcaloides)	Turbidez definida (++)	(-)	(-)	(++)
MAYER (Alcaloides)	Precipitado (+++)	(-)	(-)	(+++)
LIEBERMANN BURCHARD (Triterpenos- esteroides)	Rosado-Azul Verde intenso Verde oscuro negro (+)	(+)	(-)	
CATEQUINAS	Mancha verde carmelita (+)		(+)	
RESINAS	Precipitado (+)		(-)	
FEHLING (Azucares reductores)	Rojo Precipitado Rojo (+)		(+)	(+)
CLORURO FÉRRICO (Fenoles-taninos)	Rojo vino Verde intenso Azul (+) Marrón presencia de ácidos alifáticos		(+)	(+)
NINHIDRINA			(-)	
ESPUMA (Saponinas)	Presencia de Espuma por más de 2 min		(-)	(+)

BORNTRAGER (Quinonas)	Rosado(++) Rojo(+++)		(-)	
SHINODA (Flavonoides)	Amarillo – Naranja Carmelita o Rojo (+)		(+)	(+)
ANTOCIANIDINAS (Secuencias de grupos de flavonoides)	Rojo (++) Marrón (+++)		(-)	
MUCÍLAGOS	Consistencia gelatinosa (+)			(-)
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRIGENTES				(-)

Realizado por: Belén Moyano, 2018

El tamizaje fitoquímico fue realizado con el objetivo de identificar la presencia de metabolitos secundarios en la raíz de *Piper peltatum* L., mediante reacciones colorimétricas y aparición de precipitado.

En la Tabla 2-3 se observan los resultados obtenidos, en el extracto etéreo se identificó la presencia de compuestos grasos, lactonas, cumarinas, triterpenos y esteroides. En el caso de los ensayos realizados en el extracto etanólico se identificó la presencia de lactonas, cumarinas, alcaloides, catequinas, azúcares reductores, fenoles, taninos y flavonoides. Por último en el extracto acuoso dieron positivo a diferentes compuestos como alcaloides, azúcares reductores, fenoles, taninos, saponinas y flavonoides. Dichos compuestos podrían ser los responsables de las actividades biológicas señaladas en estudios anteriores.

Las especies vegetales sintetizan un sin número de metabolitos secundarios los mismos que se caracterizan por tener un efecto farmacológico que a su vez puede ser sintetizados para formular nuevos fármacos que mejoren la salud de la población.

Los flavonoides y fenoles son compuestos que además de proporcionar el color característico a las flores (Heinrich, 2015, pp. 3-8), según estudios proporcionan actividad antioxidante debido a la presencia de grupos hidroxilo de tipo fenólico en la mayoría de sus estructuras químicas (Vásquez, 2015, pp. 33-43), la identificación *in vitro* de flavonoides ha permitido determinar que la actividad antioxidante que posee puede llegar a ser más fuerte que la vitamina C y E dependiendo de las concentraciones utilizadas (Segev et al., 2015: pp. 115-119). Además los flavonoides tienen una amplia gama de actividades biológicas como: efecto diurético, antimicrobiano, antiviral, tratamiento en enfermedades neurodegenerativas, anticancerosos, ansiolíticos, antifúngica, antialérgica, antitrombótica y otros. Lo que hace que sea un compuesto de interés para otro tipo de investigaciones (Balasundram y Samman, 2006: pp. 1911-203).

Se encontraron triterpenos y esteroides, los cuales son de interés farmacológico debido a su relación con las hormonas. Los esteroides también presentan actividades analgésicas y antiinflamatorias (Ganesh, 2014, pp. 1-9).

Se ha identificado la presencia de saponinas las cuales poseen propiedades que benefician a la formación de espuma por lo que pueden ser utilizados como detergentes ya que tiene un comportamiento similar al jabón en agua, además son compuestos que actúan como defensa frente a patógenos e insectos en las plantas. También se ha demostrado que las saponinas presentan actividad farmacológica como: antimalárica, antialérgica, insecticida, antidiabética, anticancerosa y antiinflamatoria (Mroczek, 2015, pp. 577-605).

Se ha encontrado también la presencia de alcaloides en el extracto acuoso, estos compuestos cumplen diversas funciones en las plantas, como defensas naturales contra animales y hongos. Según la dosis y la duración del tratamiento, sus usos pueden ser desde analgésicos, anestésicos, curativos o psicotrópicos (Heinrich, 2015, pp. 3-8).

En estudios realizados al extracto etanólico de *Piper amalago* especie perteneciente a la familia Piperaceae demuestra que la presencia de grupos fitoquímicos tales como flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, terpenoides y saponinas favorecen a la actividad diurética ya que proveen efectos favorables sobre los procesos fisiológicos del riñón, probablemente: aumentando la capacidad de ahorro de potasio, la unión con el receptor de adenosina A1 (receptor asociado con la actividad diurética) o mediante la inhibición de la reabsorción tubular de agua y los aniones. Por lo tanto se podría decir que el extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* presenta la misma actividad debido a la presencia de estos metabolitos (Aziz et al., 2014; Novaes , 2014a)

3.3 Control de calidad realizado al extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L.

Tabla 3-3: Resultados del control de calidad del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L.

Parámetros	Resultados
Características Organolépticas	Aspecto: Líquido pegajoso
	Determinación del color: Marrón
	Determinación del olor: Alcohólico Aromático
	Determinación del sabor: Amargo ligeramente astringente
Densidad Relativa	0.89 g/ml
Índice de Refacción	1.36
Determinación de pH	6.78
Determinación de Sólidos Totales	1.12 %

Realizado por: Belèn Moyano, 2018

En la Tabla 3-3, se puede observar que el extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L. presentó un aspecto líquido pegajoso con olor alcohólico aromático, el cual se relaciona a la presencia de un alto contenido de compuestos fenólicos (Guclu et al., 2016: pp. 1-13), también mostró una coloración marrón y sabor amargo ligeramente astringente. En cuanto al pH se obtuvo un resultado de 6.78, indicando que el extracto es ligeramente ácido debido a la presencia de compuestos como: flavonoides, fenoles, taninos, ente otros (Romero et al., 2005: pp. 1-50).

Se analizaron también otros parámetros como: el porcentaje de solidos totales cuyo resultado fue 1,12%, el índice de refracción con un resultado de 1,36 y por último la densidad relativa con un resultado de 0,89 g/mL, demostrando que existe una buena solubilidad de los metabolitos en el solvente utilizado.

3.4 Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

La concentración de fenoles en el extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L., fue cuantificada por el método Folin-Ciocalteu, para lo cual se elaboró una curva de calibración de ácido gálico, proporcionando la siguiente ecuación de la recta:

$$Y = 0.0014x + 0,0144 \text{ con un } R^2 \text{ de } 0.999$$

Los valores obtenidos de cada absorbancia fueron reemplazados en la ecuación de la recta del estándar obteniendo los resultados expresados en la siguiente tabla.

Tabla 4-3: Resultado de la cuantificación de Fenoles Totales

SUSTANCIA DIURÉTICA	FENOLES TOTALES	
	mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco	G equivalentes de ácido gálico/100g de extracto seco (%EQFT)
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE RAÍZ DE <i>Piper peltatum</i> L.	274,86±3,27	27,49±0,33

Realizado por: Belén Moyano, 2018

En la tabla 4-3, se observa que el contenido de fenoles totales presentes en la raíz de *Piper peltatum* L. fue de 274,86 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco, es decir 27,49 g equivalentes de ácido gálico/100 g de extracto seco (%EQFT).

El contenido de fenoles totales es relativamente alto y podría estar relacionado con la actividad diurética ya que según bibliografía estos compuestos actúan a nivel de la nefrona aumentando la excreción urinaria, también se caracterizan por ser antioxidantes, prevenir enfermedades inflamatorias y cardiovasculares, además son agentes quimioprotectores contra el cáncer (Coral et al., 2012; Aziz et al., 2014).

3.5 Cuantificación de Flavonoides Totales

La concentración de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L., fue cuantificada mediante técnicas espectrofotométricas con tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró una curva de calibración de quercetina, proporcionando la siguiente ecuación de la recta:

$$Y = 0.0014x + 0,0144 \text{ con un } R^2 \text{ de } 0.999$$

Los valores obtenidos de cada absorbancia fueron reemplazados en la ecuación de la recta del estándar de quercetina obteniendo los resultados expresados en la siguiente tabla.

Tabla 5-3: Resultado de la Cuantificación de Flavonoides

SUSTANCIA DIURÉTICA	FLAVONOIDES	
	mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco	g equivalentes de quercetina/100g de extracto seco (%EQFT)
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Piper peltatum</i> L.	86,62±13,67	8,66±1,37

Realizado por: Belén Moyano , 2018

Como se observa en la tabla 5-3, el contenido de flavonoides totales presentes en el extracto de raíz de *Piper peltatum* L. fue de 86,62 mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco, es decir 8,66g equivalentes de quercetina/100 g de extracto seco (%EQFT).

Los flavonoides son metabolitos secundarios que actúan como antioxidantes debido a que impiden las reacciones catalizadoras de los radicales libres y quelar metales, también intervienen en procesos de regulación y control de crecimiento de la planta (Aziz et al., 2014: pp.1121-1125).

Además, según bibliografía los flavonoides no solo abundan en las partes aéreas jóvenes de las plantas como las hojas, frutos y flores sino que también pueden estar presentes en la raíz debido a que esta actúa como un órgano de acumulación y reserva de nutrientes, agua, minerales y metabolitos los mismos que son liberados hacia las demás partes de la planta a través de la exudación con la finalidad de que actúen como defensa contra depredadores naturales (insectos o microorganismos), atrayentes para polinizadores, muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos , así como también interviene en el crecimiento y reproducción de las plantas entre otros (Vásquez, 2015; Anaya et al., 2001).

3.6 Capacidad Antioxidante

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L., se evaluó por el método de inhibición del DPPH el cual reporta sus resultados como IC50 o también denominada concentración media inhibitoria, es decir la concentración efectiva del antioxidante necesario para inhibir la concentración inicial de DPPH en un 50%. Para obtener dicha concentración del extracto de la planta, se midió el porcentaje de captación de radicales libres a diferentes concentraciones del extracto como se observa en la Tabla 6-3 y en el Gráfico 1-3.

Tabla 6-3: Resultado de la Capacidad Antioxidante del extracto Hidroalcohólico liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.

Concentración del extracto	% de Captación de Radicales Libres
10 ppm	6.99
20 ppm	7.50
50 ppm	9.06
100 ppm	9.31
200 ppm	12.03
500 ppm	18.50
1000 ppm	35.96

Realizado por: Belén Moyano, 2018

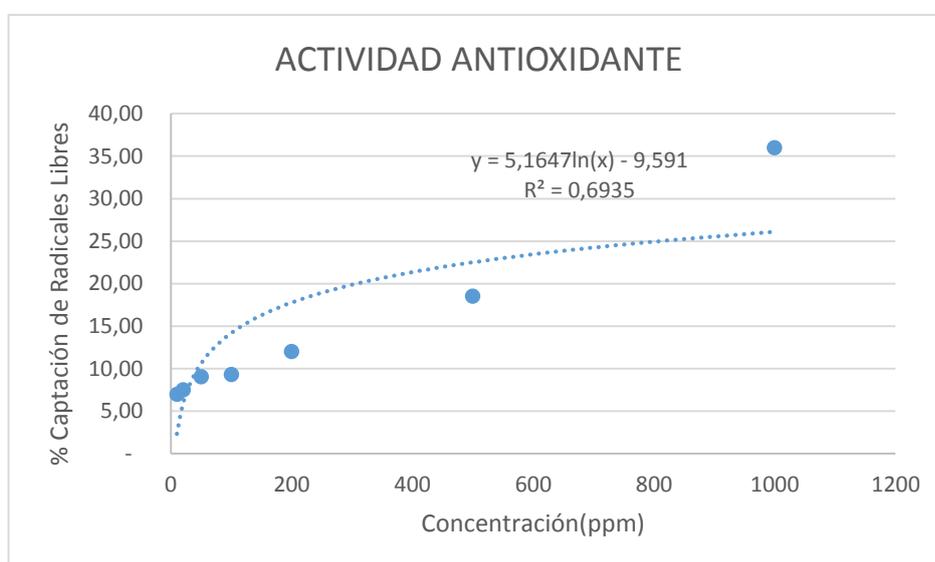


Gráfico 1-3: Curva de la concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.

Realizado por: Belén Moyano, 2018

En el Gráfico 1-3 se puede observar que a mayor concentración mayor actividad antioxidante.

En la tabla 6-3 se observa que el extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L. a una concentración de 1000ppm el porcentaje de captación de radicales libres de DPPH es de 35.96% determinando así que el extracto tiene una actividad antioxidante baja, por lo que para alcanzar el 50% de la actividad antioxidante requiere de una concentración de 102 489 ppm, estos resultados pueden estar relacionados a diversos factores (climáticos, atmosféricos, topográficos y edáficos), como también a la parte de la planta que se utilizó en la investigación.

3.7 Evaluación de la actividad diurética de la raíz de *Piper peltatum* L. en *rattus norvegicus*

Tabla 7-3: Efecto de la raíz de *Piper peltatum* L. en el volumen de orina utilizando ratas de laboratorio en un intervalo de 6 horas.

GRUPO	6 horas después de la administración de la droga			
	Dosis	Volumen de orina (mL)	Acción diurética	Actividad diurética
Control negativo	5 mL/g	1±0	1	-
Control positivo	10 mg/Kg	4.53±2.532	4.53	1
ELRPP	25 mg/Kg	1.7±0.833	1.7	0.38
ELRPP	100 mg/kg	3.8±1.114	3.8	0.84
ELRPP	200 mg/kg	2.8±0.346	2.8	0.62

ELRPP: extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.

Realizado por: Belén Moyano , 2018

La furosemida es un diurético ampliamente usado en la práctica clínica debido a que presenta una muy buena absorción, biodisponibilidad y se une extensamente a un 95% de proteínas plasmáticas (Vargo et al.,1995:p. 608).

Como se observa en la tabla 7-3, posteriormente a la administración oral de las tres diferentes dosis (25, 100 y 200 mg/kg) se originó efectos diuréticos notables al compararlos con el estándar (furosemida 10 mg/kg) facilitando una base cuantitativa para explicar su uso como diurético en la medicina tradicional, este efecto farmacológico podría ser atribuido a la presencia de grupos fitoquímicos tales flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, terpenoides y saponinas determinados anteriormente en el tamizaje fitoquímico ya que proporcionan efectos favorables en los procesos físicos del riñón (Aziz et al., 2014; Novaes , 2014a).

También se puede observar que hay diferencias en el efecto diurético entre los tres tratamientos del extracto de raíz de *Piper peltatum* L. ya que va variando según las dosis siendo mayor la actividad diurética a una dosis de 100mg/kg seguida de la de 200mg/ kg y por último la dosis de 25mg/kg. Esto podría estar relacionado a que en la investigación se utilizó un extracto bruto el cual está compuesto por diferentes sustancias que pueden estar provocado interferencia con la absorción, distribución o unión al receptor de los componentes activos (Nedi et al., 2004: p.60).

Tabla 8-3: Volumen de orina excretada por las ratas de laboratorio por influencia del extracto de raíz de *Piper peltatum* L.

GRUPO	1H	2H	3H	4H	5H	6H	V.TOTAL
Control negativo (CMC 0,9%)	0.13±1.15	0.17±0.15	0.3±0.17	0.23±0.12	0.07±0.06	0.1±2.6	1
Furosemida (10 mg/mL)	2.47±0.50	0.33±0.31	0.27±0.12	0.53±0.92	0.53±0.92	0.4±0.69	4.53
ELRPP 25(mg/kg)	0.73±1.10	0.13±0.12	0.27±0.31	0.2±0.35	0.13±0.23	0.27±0.31	1.7
ELRPP 100 (mg/kg)	0±0	0.0±0.0	0.8±1.39	0.67±1.15	1.67±1.45	0.67±1.15	3.8
ELRPP 200 (mg/kg)	0.07±0.12	0.27±0.31	0.87±0.83	0.6±0.53	0.4±0.4	0.6±0.87	2.8

CMC: carboximetilcelulosa. ELRPP: extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.

Realizado por: Belén Moyano , 2018

La furosemida se absorbe bien por vía oral, tiene una buena biodisponibilidad, iniciando su acción por vía oral a los 10-30 min y alcanza el efecto máximo a los 20-40 min con una duración de 4-6 horas tiene la capacidad de unirse intensamente a proteínas plasmáticas (Lüllmann et al., 2010:p.158). En la tabla 8-3 se puede observar que la furosemida posee un efecto diurético instantáneo a la primera hora después de la administración en comparación al control negativo y a las dosis utilizadas en el ensayo, lo cual está relacionado a lo mencionado anteriormente.

La diferencia horaria a la cual la furosemida cumple con el efecto en relación a las dosis del extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L. puede estar asociada con las características de absorción gastrointestinal de los componentes presentes en el extracto (Nedi et al., 2004:pp. 60-61).

3.8 Evaluación de los electrolitos urinarios

Tabla 9-3: Efecto de la raíz de *Piper peltatum* L. sobre la excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio en muestra de orina de 6 horas.

Grupos	Dosis	Na+ en orina (mmol/L)	K + en orina (mmol/L)	Cl en orina (mmol/L)	Na+ Index	K + Index	Cl ⁻ Index
CMC	0,9%	110.33±17.04	51.5±3.65	76.57±22.78	1	1	1
Furosemida	10 mg/Kg	132.27±16.24	33.07±3.70	127.07±21.36	1.19	0.64	1.66
ELRPP	25 mg/kg	82.47±13.66	66.93±26.28	80.37±16.51	0.75	1.30	1.05
ELRPP	100 mg/kg	137.73±14.89	125.6±20.44	113.6±19.70	1.25	2.44	1.48
ELRPP	200 mg/kg	115.63±10.43	88.87±15.01	102.47±1.35	1.05	1.73	1.39

CMC: carboximetilcelulosa. ELRPP: extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.

INDEX= excreción en el grupo de ensayo / excreción en el grupo de control.

Realizado por: Belén Moyano , 2018

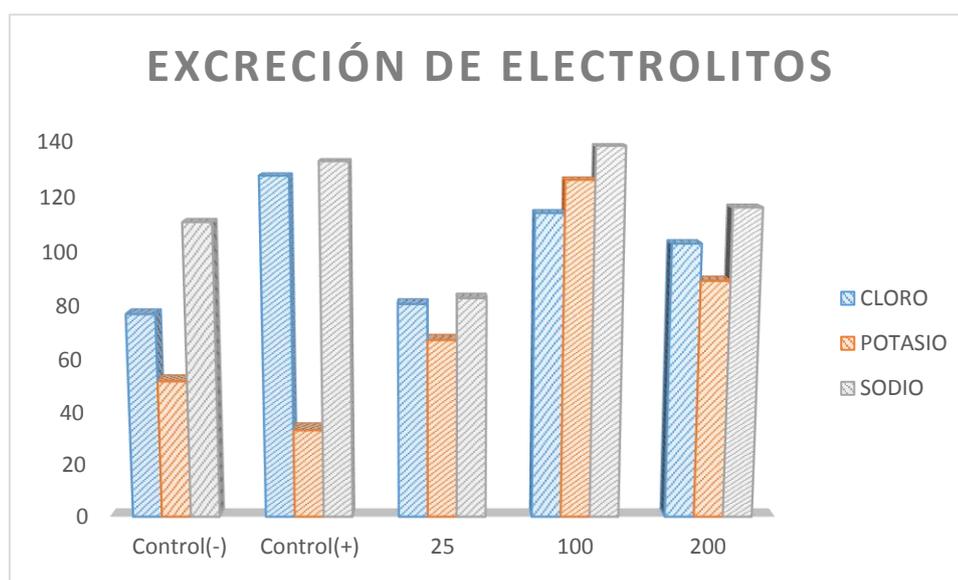


Gráfico 2-3: Excreción urinaria de electrolitos en ratas de laboratorio por influencia de las diferentes dosis administradas.

Realizado por: Belén Moyano , 2018

Como se observa en la tabla 9-3, el extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L en las tres dosis mostró un incremento significativo en la concentración de iones potasio, sodio y cloro por lo que poseen importantes efectos saluréticos y natriuréticos (Lüllmann et al., 2010; Novaes , 2014a).

La concentración de electrolitos se relaciona con los diuréticos de tipo asa como la furosemida que actúa inhibiendo el cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ ubicado en la membrana luminal del segmento grueso de la rama ascendente del asa de Henle (Lüllmann et al., 2010:p.158).

Sin embargo, se evidenciaron menores concentraciones de potasio, aunque mayores de sodio y cloro y en el caso de la dosis de 100mg/kg del extracto de raíz de *Piper peltatum* L. eliminó una mayor cantidad de electrolitos en relación a la furosemida. Esto puede deberse a que a esta dosis existe una mayor cantidad de metabolitos activos que tiene una larga vida y pueden ser incluso de acción prolongada en el sitio de acción (Nedi et al., 2004: p.60).

Tabla 10-3: Efecto natriurético, salurético e inhibición de la anhidrasa carbónica de la raíz de *Piper peltatum* L. en ratas de laboratorio en muestras de orina recogidas por 6 horas.

Grupos	Dosis	Efecto salurético ($\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$)	Efecto natriurético (Na^+ / K^+)	CAI ($\text{Cl}^- / [\text{Na}^+ + \text{K}^+]$)
CMC	0,9%	186.90±27.32	2.14±0.20	0.48±0.17
Furosemida	10 mg/Kg	259.33±37.60	4.05±0.81	0.76±0.07
ELRPP	25 mg/kg	162.83±26.79	1.49±1.01	0.54±0.15
ELRPP	100 mg/kg	251.33±30.20	1.11±0.12	0.44±0.09
ELRPP	200 mg/kg	218.10±11.06	1.33±0.30	0.50±0.02

ELRPP: extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L. **CMC:** carboximetilcelulosa

Realizado por: Belén Moyano , 2018

En la tabla 20-3, se observa que las tres dosis (25mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg) del extracto de raíz de *Piper peltatum* L., presentan un efecto salurético significativo al compararlo con la furosemida, esto se debe al aumento en la excreción de iones sodio y cloro causados por los tratamientos en la nefrona.

También se puede diferenciar que el efecto natriurético no es significativo al compararlo con la furosemida, esta disminución del efecto entre el fármaco de referencia y el extracto de ensayo se debe a que existe una mayor excreción del ion sodio en comparación al potasio.

En cuanto a la anhidrasa carbónica es una enzima que se encuentra en las células de los túbulos renales sobre todo en el túbulo contorneado proximal la cual va hacer inhibida por diuréticos que actúan en ese sitio de acción como la acetazolamida y la diclorfenamida impidiendo la reabsorción del Na^+ , HCO_3^- en el túbulo proximal, de este modo aumenta la eliminación del bicarbonato y por consiguiente la de los iones Na^+ y Cl^- que llegarán en gran proporción al asa de

Henle, a su vez provocará la eliminación del K^+ debido a la alta cantidad de Na^+ que llega al túbulo distal, produciendo acidosis metabólica como efecto adverso. Según bibliografía los diuréticos de asa como la furosemida también provocan una ligera inhibición en esta enzima. (Flórez, 2016, p.827).

El extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* a las dosis de (25mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg) posiblemente podrían presentar una ligera inhibición sobre esta enzima similar a la furosemida esto puede deberse también a la presencia de compuestos como: flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, terpenoides y saponinas.

3.9 Análisis estadístico

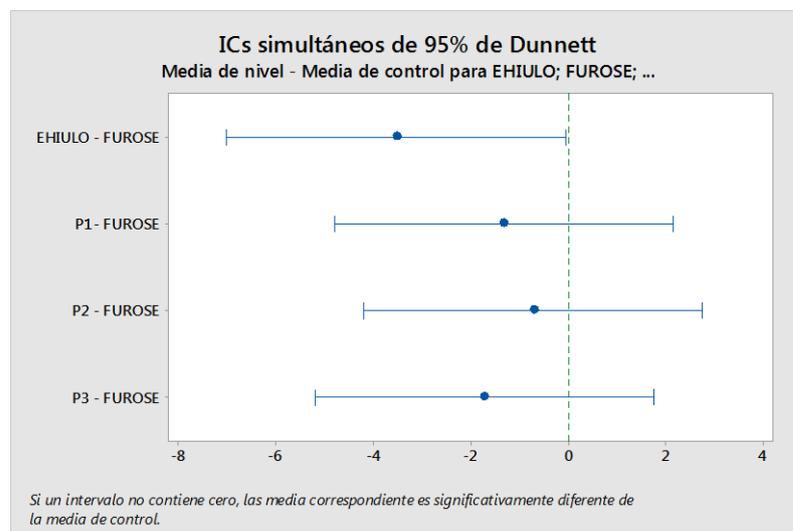


Gráfico 3-3: Tratamientos v.s Estándar Test de Dunnett

EHIULO: grupo control negativo carboximetilcelulosa, **P1:** dosis 25 mg/kg, **P2:** dosis 100mg/kg, **P3:** dosis 200mg/kg

Realizado por: Belén Moyano, 2018

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad diurética fueron analizados utilizando el software estadístico Minitab 18 mediante el diseño completamente aleatorio el cual trabaja con un factor (dosis) y una variable respuesta (excreción urinaria en ml y excreción de electrolitos)

Se utilizó el test ANOVA de un solo factor que dio como resultado $p=0.115$ por lo cual se acepta la hipótesis alternativa ($p<0.05$) esto quiere decir que existen diferencias significativas en la excreción urinaria por causa de la dosis administrada.

Al aceptar la hipótesis alternativa mencionada anteriormente existe la necesidad de determinar cuál de ellas es diferente para ello utilizamos el test de Dunnett el cual es usado para comparar los tratamientos v.s el estándar.

En el gráfico 3-3 se puede observar que la CMC en relación a la furosemida es diferente esto se debe a que la CMC no es un diurético, con respecto a los tres tratamientos (25 mg/kg, 100 mg/kg,

200 mg/kg) se puede decir que no presentan diferencias significativas con respecto al estándar (furosemida) llegando a la conclusión que éstos presentan una actividad diurética.

También para las excreciones de electrolitos de Na, K y CL se utilizó el test ANOVA de un solo factor que dio como resultado para sodio $p=0.007$, potasio $p=0.000$, cloro $p=0.029$ por lo que se acepta la hipótesis nula ($p<0.05$) esto quiere decir que no existen diferencias significativas con respecto al estándar furosemida.

CONCLUSIONES

Se determinó que la raíz de *Piper peltatum* cumple con los parámetros de control de calidad ya que no contiene sustancias extrañas provenientes del área de recolección y almacenamiento haciéndola idónea para ser estudiada. A través del tamizaje fitoquímico se identificó principalmente la presencia de compuestos grasos, lactonas, cumarinas, triterpenos, esteroides, alcaloides, catequinas, azúcares reductores, fenoles, taninos, saponinas y flavonoides.

Se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de fenoles totales y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico de raíz de *Piper peltatum* L., el cual fue de 274.86 ± 3.27 mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto seco para fenoles, mientras que la cantidad de flavonoides fue de $86,62 \pm 13,67$ mg equivalentes de quercetina/g de extracto seco.

Se determinó que a una concentración de 1000 ppm el porcentaje de captación de radicales libres de DPPH es de 35.96% determinando así que el extracto no tiene una actividad antioxidante significativa.

Se comprobó la actividad diurética del extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L., a tres dosis (25mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg), observando que, tanto el análisis del volumen de orina como de electrolitos no existió diferencia significativa respecto a la furosemida. Estos resultados pueden estar relacionados a la presencia de grupos fitoquímicos tales como flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, terpenoides y saponinas en el extracto hidroalcohólico que proporcionan efectos favorables en los procesos fisiológicos del riñón.

RECOMENDACIONES

Se requieren más investigaciones tanto farmacodinámicas como fitoquímicas para determinar los activos responsables de la actividad y comprender el mecanismo del efecto diurético a nivel molecular.

Se sugiere una evaluación a nivel toxicológico que ayude a obtener una mayor información acerca de los riesgos para la salud tanto a nivel de dosis repetida como a nivel histológico.

Se sugiere realizar futuras investigaciones en la raíz de *Piper peltatum* para poder determinar si esta presenta otros efectos farmacológicos, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos.

BIBLIOGRAFÍA

Anaya, A.L; et al. *Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación*. S.l.: Plaza y Valdes, 2001, ISBN 978-968-856-862-0.

Araújo Cordeiro, K.C.F; et al. Biosynthesis and antioxidant activity of 4NRC β -glycoside. *Tetrahedron Letters*, vol. 54, no. 48, 2013, pp. 6656-6659. ISSN 00404039.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1016/j.tetlet.2013.09.133>.

Avendaño, L.H. y Hernando. *Nefrología clínica*. S.l.: Ed. Médica Panamericana, 2008, ISBN 978-84-9835-186-6.

Ayus, J.C. y Caramelo, C. *Agua, electrolitos y equilibrio ácido-base: aprendizaje mediante casos clínicos*. S.l.: Ed. Médica Panamericana, 2006, ISBN 978-84-7903-557-0.

Aziz, M; et al. Phytochemical Screening and Evaluation of the Diuretic Activity of Aqueous Methanol Extract from Aerial Parts of *Mentha viridis* Linn (Labiatae) in Albino Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2014, vol. 13, no. 7, pp. 1121. ISSN 1596-9827, 1596-5996.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.4314/tjpr.v13i7.16>.

Balasundram, N., Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 2006, vol. 99, no. 1, pp. 191-203. ISSN 03088146.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1016/j.foodchem.2005.07.042>.

Beltrán, A.I.J. Analisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae), 2013, pp. 61.

Collazos, A.Y.M. Estudio fitoquímico de hojas de la especie vegetal *Piper catripense*, 2017, pp. 75.

Coral, C.B.S; et al. *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. S.l.: Editorial UNED, 2012, ISBN 978-84-362-6219-3.

Desmarchelier, C; et al. Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants Used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *International Journal of Pharmacognosy*, 1997, vol. 35, no. 4, pp. 288-296. ISSN 0925-1618.
Disponibile en: <http://dx.doi.org.10.1076/phbi.35.4.288.13303>.

Diehl, K.-H; et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 2001, vol. 21, no. 1, pp. 15-23. ISSN 0260-437X, 1099-1263.
Disponibile en: <http://dx.doi.org.10.1002/jat.727>.

Domínguez, A.Q. *Introducción Al Manejo de Animales de Laboratorio: Roedores Y Pequeñas Especies*. S.l.: UADY, 1997. ISBN 978-968-7556-24-6.

Duke, J.A. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. S.l.: CRC Press, 2018. ISBN 978-1-351-46732-2.

Fernández, P.L. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica (eBook online)*. S.l.: Ed. Médica Panamericana, 2015. ISBN 978-84-9835-481-2.

Flórez, J. Fármacos diuréticos, 2016, pp. 16.

Ganesh Chandra, L.S. Phytochemical Screening of Certain Medicinal Plants of Mizoram, India and their Folklore Use. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development* [en línea], 2014, vol. 02, no. 01. [Consulta: 29 octubre 2018]. ISSN 23760214. DOI 10.4172/2376-0214.1000136.
Disponibile en: <http://www.omicsgroup.org/journals/phytochemical-screening-of-certain-medicinal-plants-of-mizoram-india-and-their-folklore-use-2376-0214.1000136.php?aid=36199>.

Guclu, G; et al. Determination of Volatiles by Odor Activity Value and Phenolics of cv. Ayvalik Early-Harvest Olive Oil. *Foods*, 2016, vol. 5, no. 4, pp. 46. ISSN 2304-8158.
Disponibile en: <http://dx.doi.or.10.3390/foods5030046>.

Gustafson, K.R; et al. HIV inhibitory natural products. 6. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1992, vol. 57, no. 10, pp. 2809-2811. ISSN 0022-3263, 1520-6904.

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jo00036a010>.

Hau, J. y Schapiro, S.J. *Handbook of Laboratory Animal Science, Volume I, Third Edition: Essential Principles and Practices* [en línea], 2010, 3rd. S.l.: CRC Press. [Consulta: 15 octubre 2018]. ISBN 978-1-4200-8455-9.

Disponible en:

<http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=BC168B5C73E0DC31DA1A610484CB0057>.

Heinrich, M. *Ethnopharmacology*. S.l.: John Wiley & Sons, 2015. ISBN 978-1-118-93074-8.

Hernández, D.S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas, 2006a, pp. 5.

Hohenfellner, M. y Santucci, R.A. *Emergencies in Urology*. S.l.: Springer Science & Business Media, 2007. ISBN 978-3-540-48605-3.

IUCN *Rattus norvegicus*: Ruedas, A.R.: The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T19353A22441833 [en línea]. 1 septiembre 2016. S.l.: International Union for Conservation of Nature. [Consulta: 15 octubre 2018].

Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/19353/0>.

Jarillo, J.M. Mecanismo de acción de los diuréticos, 2017, pp. 24.

Kato, M.J. y Furlan, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure Appl. Chem.* 2007, pp. 529–538.

Kau, S.T; et al. A method for screening diuretic agents in the rat. *Journal of Pharmacological Methods*, 1984, vol. 11, no. 1, pp. 67-75. ISSN 01605402.

Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0160-5402\(84\)90054-8](http://dx.doi.org/10.1016/0160-5402(84)90054-8).

Kunle. Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* [en línea], 2012, vol. 4, no. 3. [Consulta: 4 noviembre 2018]. ISSN 2141243X.

Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5897/IJBC11.163>. <http://dx.doi.org>.

Lipschitz wj; et al. Bioassay of diuretics. *J Pharmacol Exp Ther* 1943;79:97-110

López, D.G. *Guía medicinal y espiritual de plantas tropicales: Los secretos de las plantas desde el Caribe y la Amazonía hasta el Mediterráneo*. S.l.: Angels Fortune [Editions], 2017. ISBN 978-84-946782-4-0.

Lüllmann, H; et al. *Farmacología: texto y atlas*. S.l.: Ed. Médica Panamericana, 2010. ISBN 978-84-9835-217-7.

Luz, A; et al. Volatile Constituents of Brazilian Piperaceae. Part 4. Essential Oil Composition of *Piper dactylostigium*, *P. plurinervosum* and *P. vitaceum*. *Journal of Essential Oil Research*, 2000, vol. 12, no. 1, pp. 94-96. ISSN 1041-2905, 2163-8152.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1080/10412905.2000.9712050>.

Miranda, M. Farmacognosia y productos naturales: Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. 6 ed. La Habana-Cuba: F.Varela, 2006, pp.32-62.

Mongelli, E; et al. Cytotoxic 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* Inhibits Topoisomerase I Activity. *Planta Medica*, 1999, vol. 65, no. 04, pp. 376-378. ISSN 0032-0943, 1439-0221. DOI 10.1055/s-2006-960793.

Model, G. Diuretics in primary hypertension – Reloaded. ,2016, pp. 8-11. DOI 10.1016/j.ihj.2016.08.013.

Moraes, M.S; et al. Essential Oil of the *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Journal of Essential Oil Research*, 2004, vol. 16, no. 1, pp. 15-16. ISSN 1041-2905, 2163-8152.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1080/10412905.2004.9698637>.

Mora, R.M. Diuréticos. FMC - Formación Médica Continuada en Atención Primaria [en línea], 2015, vol. 22, no. 1, pp. 29-36. ISSN 11342072. DOI 10.1016/S1134-2072(15)70882-0. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1134207215708820>.

Mroczek, A. Phytochemistry and bioactivity of triterpene saponins from Amaranthaceae family. *Phytochemistry Reviews*, 2015, vol. 14, no. 4, pp. 577-605. ISSN 1568-7767, 1572-980X.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1007/s11101-015-9394-4>.

Nedi, T; et al. Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, vol. 95, no. 1, pp. 57-61. ISSN 03788741.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1016/j.jep.2004.06.017>.

Noriega, A.G. Determinación del efecto diurético del extracto acuoso de las plantas medicinales *Citrus reticulata* (mandarina), *Citrus paradisi* (toronja) y *Citrus aurantifolia* (lima). [en línea]. 2015, S.l.: Universidad San Carlos de Guatemala.

Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3707.pdf.

Novaes, A; et al. Diuretic and antilithiasic activities of ethanolic extract from *Piper amalago* (Piperaceae). *Phytomedicine*, 2014a, vol. 21, no. 4, pp. 523-528. ISSN 09447113.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1016/j.phymed.2013.10.014>.

Núñez, V; et al. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from Bothrops snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, 2005, vol. 66, no. 9, pp. 1017-1025. ISSN 00319422.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1016/j.phytochem.2005.03.026>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [en línea], 2013, pp. 72. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>.

Pérez, M; et al. Ethnopharmacological and preclinical study of diuretic activity in medicinal and food plants used by Cuban population.,2011 , pp. 8.

Puertas-Mejía, M.A; et al. Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2009, vol. 14, no. 2, pp. 0-0. ISSN 1028-4796.

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. Métodos de Farmacognosia. Madrid-España: s.n. 2003, p.95

Roger, J.D.P. *Salud por las plantas medicinales*. S.l.: Editorial Safeliz,2006. ISBN 978-84-7208-106-2.

Roldan, A.A. *100 plantas medicinales escogidas: Una guía de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapéutico*. S.l.: EDAF,1997. ISBN 978-84-414-0160-0.

Romero-Fernandez, W; et al. El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2016, vol. 33, no. 2, pp. 288-299. ISSN 1726-4634.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.17843/rpmesp.2016.332.2169>.

Salazar, E.B; et al. Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana. *Scientia et technica* [en línea], 2007, vol. 1, no. 33. [Consulta: 15 octubre 2018]. ISSN 2344-7214. DOI 10.22517/23447214.6157.

Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6157>.

Segev, A; et al. Determination of Polyphenols, Flavonoids, and Antioxidant Capacity in Colored Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Food Science*, 2010, vol. 75, no. 2, pp. 115-119. ISSN 00221147, 17503841.

Disponible en: <http://dx.doi.org.10.1111/j.1750-3841.2009.01477.x>.

Tinitana, F., et al., Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* [en línea], 2016, vol. 12, pp. 1-18. ISSN 1746-4269. DOI 10.1186/s13002-016-0100-4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>.

Tsay, H.-S; et al. *Medicinal Plants - Recent Advances in Research and Development*. S.l.: Springer, 2016. ISBN 978-981-10-1085-9.

Vargo, D.L; et al. Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of torsemide and furosemide in patients with congestive heart failure*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1995, vol. 57, no. 6, pp. 601-609. ISSN 0009-9236, 1532-6535.

Disponible en: [http://dx.doi.org.10.1016/0009-9236\(95\)90222-8](http://dx.doi.org.10.1016/0009-9236(95)90222-8).

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*, 2015, vol. 6, no. 1, pp. 33-43. ISSN 2307-5260.

Wilkins, L.W. *Straight A's in Fluids and Electrolytes*. S.l.: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 978-1-58255-659-8.

Zuany A.C; et al. Screening for antimalarial activity in the genus *Potomorphe*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1988, vol. 24, no. 1, pp. 101-106. ISSN 03788741.

Disponibile en: [http://dx.doi.org.10.1016/0378-8741\(88\)90140-7](http://dx.doi.org.10.1016/0378-8741(88)90140-7)

ANEXOS

ANEXO A. Recolección, secado y triturado de la raíces de *Piper peltatum*



ANEXOS B. Determinación del contenido de humedad de las raíces del material vegetal



ANEXOS C. Determinación del contenido de cenizas totales (Gráfico 1C), cenizas solubles en agua (Gráfico 2C) y cenizas insolubles en ácido clorhídrico del material vegetal (Gráfico 3C).

Gráfico 1C.



Gráfico 2C.



Gráfico 3C.



ANEXO D. Tamizaje fitoquímico de los extractos: etéreo (Gráfico 1D), metanólico (Gráfico 2D) y acuoso de las raíces de *Piper peltatum*. (Gráfico 3D)

Gráfico 1D.

Ensayo de Sudan



Ensayo de Dragendorff



Ensayo de Mayer



Ensayo de Wagner



Ensayo de Baljet



Ensayo de Liebermann-Buchari



Gráfico 2D

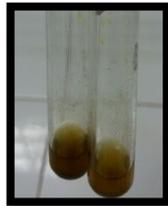
Ensayo de Catequinas Ensayo de Resinas Ensayo de Fehling Ensayo de Baljet Ensayo de Liebermann-Buchard



Ensayo de Espuma



Ensayo de Cl_3Fe



Ensayo de Ninhidrina



Ensayo de Borntrager



Ensayo de Shidona



Ensayo de Antocianidina



Ensayo de Dragendorff



Ensayo de Mayer



Ensayo de Wagner



Gráfico 3D.

Ensayo de Dragendorff



Ensayo de Mayer



Ensayo de Wagner



Ensayo de Cl_3Fe



Ensayo de Shinoda



Ensayo de Fehling



Ensayo de Espuma



Ensayo de Mucilagos



ANEXO E. Control de calidad del extracto hidroalcohólico de la muestra de ensayo.



ANEXO F. Obtención del extracto liofilizado de raíz de *Piper peltatum* L.



ANEXO G. Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método de tricloruro de aluminio (Gráfico 1G) y los flavonoides mediante el método de Folin Ciocalteu (Gráfico 2G)

Gráfico 1G

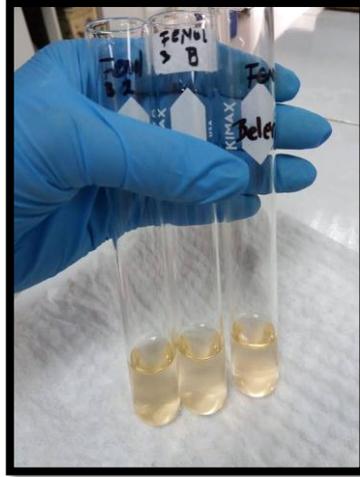


Gráfico 2G



ANEXO H. Curva de calibración del ácido gálico (Gráfico 1H) y de la quercetina (Gráfico 2H) utilizados para la cuantificación de fenoles totales y flavonoides.

Gráfico 1H

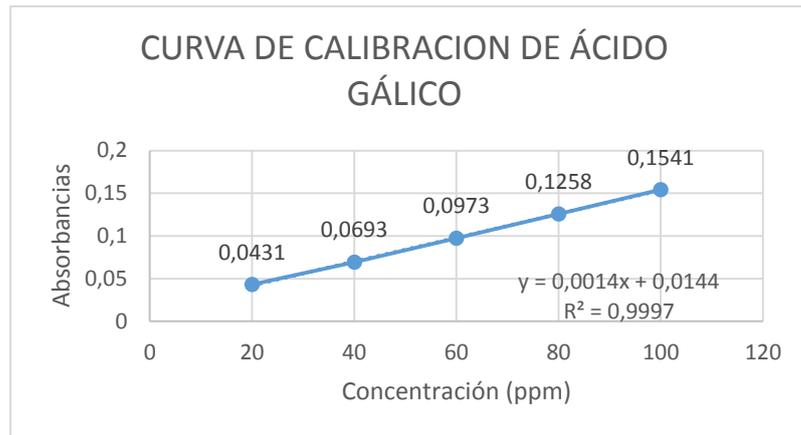
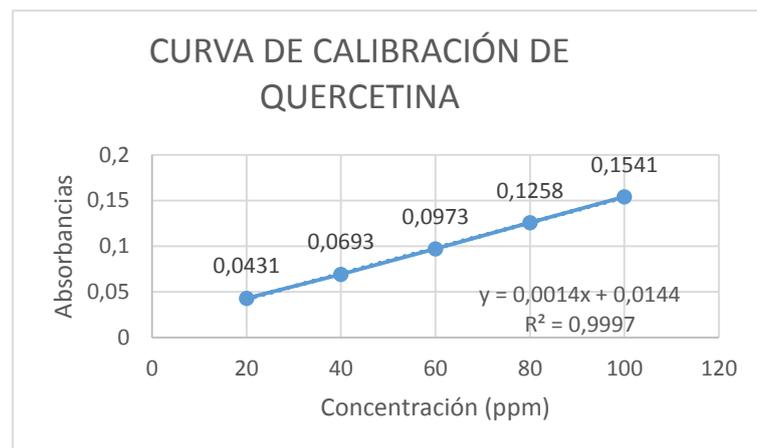
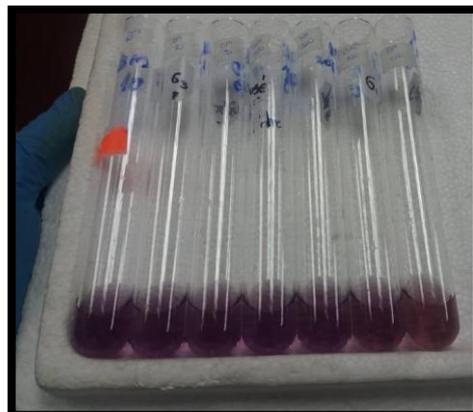


Gráfico 2H



ANEXO I. Determinación del potencial antioxidante de raíz de *Piper peltatum* L. mediante el método DPPH (2,2-Definil-1-Picrilhidrazilo)



ANEXO J. Ambientación de los animales de experimentación

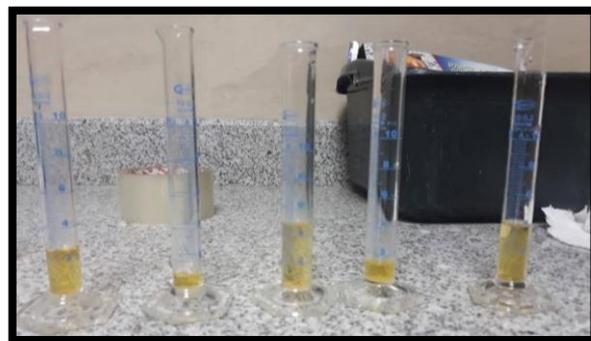


ANEXO K. Evaluación de la actividad diurética en *rattus norvegicus*., caja metabólica (Gráfico 1K) y recolección de la muestra (Gráfico 2K)

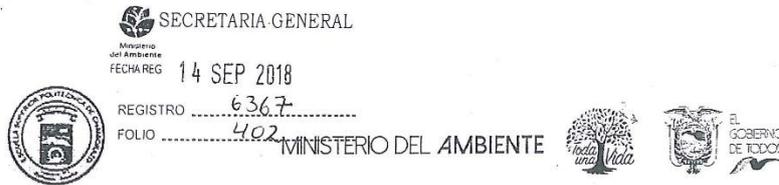
Gráfico 1K



Gráfico 2K



ANEXO L. Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica. MAE-DNB-CM-2018-0086



CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MAE-DNB-CM-2018-0086

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado: “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” comparecen, por una parte el MINISTERIO DEL AMBIENTE, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el LCDO. LÓPEZ MORA ALFREDO DANILO, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, conforme se desprende de la Acción de Personal Nro. 0945 de 02 de mayo de 2018, delegado de la máxima autoridad mediante Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará “MAE”; y, por otra parte, la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, debidamente representada por el Ing. BYRON ERNESTO VACA BARAHONA PhD., en su calidad de Rector, conforme consta del certificado emitido por el Ab. Carlos de la Cadena, Secretario General, documento que se agrega como habilitante y a quien en adelante se denomina “ESPOCH”.

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del programa de investigación científica denominado “ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE” contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3 numeral 7 establece que son deberes primordiales del Estado “(...)7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...)” y 83 numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades de las ecuatorianas y los ecuatorianos “(...) 6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible (...) 13. Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos (...)”;
2. El artículo 14 de la Norma Suprema determina que: “...Se reconoce el derecho de la...”

ANEXO M. Permiso de Movilización

MINISTERIO DEL AMBIENTE



Oficio Nro. MAE-CGZ4-DPAM-2018-2061-O

Portoviejo, 29 de noviembre de 2018

Licenciada
Karen Lisseth Acosta León
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al documento No. MAE-UAF-DPAM-2018-3104-E, esta Dirección Provincial después de revisar el expediente sobre la solicitud de orden de movilización por Contrato Marco obtenido a través de la Dirección Nacional de Biodiversidad, esta Dirección extiende la orden No. 016 para que proceda a movilizar las muestras producto del proyecto denominado " Estudio de la Biodiversidad en el Ecuador, Ecología, Conservación y su Potencial Uso Sostenible".

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Documento firmado electrónicamente

Ing. Vicente Oliverio Zavala Zavala
COORDINADOR GENERAL ZONAL 4 (MANABÍ Y SANTO DOMINGO DE LOS TSACHILAS) - DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE MANABÍ

Referencias:
- MAE-UAF-DPAM-2018-3104-E

Anexos:
- escanear0283.compressed.pdf
- Orden de movilización No. 016

Copia:
Señorita Magister
Julia Angelita Cordero Guillén
Especialista de Vida Silvestre Provincial

jc/ea



**ORDEN DE MOVILIZACIÓN # 016 PARA PERMISOS DE INVESTIGACIÓN DE ESPECIES DE VIDA SILVESTRE POR CONTRATO MARCO
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE MANABÍ MINISTERIO DEL AMBIENTE**

Portoviejo, 28 de noviembre del 2018

La Lcda. Karen Liseth Acosta León M.Sc. con número de cédula 100308901-6 de nacionalidad ecuatoriana, solicita una orden de movilización para trasladar desde Manabí hasta la ciudad de Riobamba muestras biológicas producto del proyecto científico denominado " Estudio de la biodiversidad en el Ecuador, Ecología, Conservación y su potencial uso sostenible" bajo el Contrato Marco No. MAE-DNB-CM-2018-0086 suscrito el 14 de septiembre de 2018; en conformidad con el Acuerdo Ministerial Nro. 034 de 04 de febrero de 2015, publicado en el Registro Oficial Nro. 449 de 02 de marzo de 2015.

Detalle de los especímenes colectados

Nº MAE-DNB-CM-2018-0086

No. MUESTRAS	NOMBRE COMÚN	GRUPO TAXÓNOMICO	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA COLECTADA	CODIGO	MEDIO DE PRESERVACIÓN
3	Vegetal	<i>Piper peltatum</i>	Sub-arbusto de 3m, hojas alternas, peciolo. Estado fresco		Papel periódico y cajas

Total: 3 muestras

Detalle de la movilización de especímenes

Transporte: Terrestre (X) Aéreo ()

Fecha de salida	Nombre de la aerolínea	Nombre del transporte	Número de vuelo	Hora
Desde el 28 noviembre al 15 de diciembre de 2018		Reina del camino		05H00 – 23H00

Para lo cual el Ing. Vicente Zavala Zavala.- Directora Provincial de Manabí, autoriza la movilización de los especímenes antes descritos; sin embargo no se responsabiliza por cualquier tipo de cambio

ORDEN DE MOVILIZACIÓN # 016 PARA PERMISOS DE INVESTIGACIÓN DE ESPECIES DE VIDA SILVESTRE POR CONTRATO MARCO
Calle Olmedo entre Sucre y Córdova. Portoviejo-Ecuador

Dirección: Calle Ibarra 1150 y Andaraca • Código Postal: 170625 • Cuito - Ecuador • Teléfono: 593-2-998-7900