



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA
HIALURONIDASA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
Piper umbellatum L.”**

Trabajo de titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: ARACELY ELIZABETH MORALES MENESES

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

Riobamba-Ecuador

2020

©2020, Aracely Elizabeth Morales Meneses

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.

Yo, Aracely Elizabeth Morales Meneses, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación: el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 28 de febrero de 2020



Aracely Elizabeth Morales Meneses

180478665-3

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo Trabajo experimental “**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LA HIALURONIDASA DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Piper umbellatum* L.**” realizado por la señorita **ARACELY ELIZABETH MORALES MENESES**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal autoriza su presentación.

| | FIRMA | FECHA |
|--|---|--------------|
| BQF. Valeria Isabel Rodríguez Vinueza, M.Sc. PRESIDENTE DE TRIBUNAL |  _____ | 2020/02/28 |
| BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, M.Sc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN |  _____ | 2020/02/28 |
| BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, M.Sc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL |  _____ | 2020/02/28 |

DEDICATORIA

A Dios por estar presente en cada momento de mi vida y ser la fuente principal de fuerza y fe. A mi padre y a mi mami Sandrita que ha estado conmigo en los buenos y malos momentos brindándome su apoyo y confianza incondicional, por ser el ejemplo de fuerza, constancia y lucha. A mi abuelita Hilda que siempre ha estado desde los inicios de mis estudios y quién ha sido un gran apoyo. A mi tío Fermín y a mi abuelito Román que ahora gozan de la gloria de Dios en el cielo, los que siempre creyeron en mí y estuvieron ahí con sus consejos enseñándome a no dejarse vencer de las adversidades. A todos mis tíos por ser ese soporte único que con cada palabra de aliento me motivaban a seguir adelante.

Aracely

AGRADECIMIENTO

A mi tutora BQF. Gisela Pilco, por compartir su conocimiento ser el apoyo y la guía. Al colaborador BQF. Diego Vinueza, quién ha sido mi maestro y mi guía en el proceso de esta investigación. A Marco por su apoyo incondicional en el transcurso de este trabajo. A mis amigos, que se convirtieron en mi segunda familia con quienes he compartido momentos muy especiales durante mi vida universitaria.

Aracely

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|-------------------------|------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | x |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | xi |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | xii |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xiii |
| RESUMEN | xv |
| ABSTRACT | xvi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|-----------|
| 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL..... | 4 |
| 1.1. Antecedentes de la investigación | 4 |
| 1.2. Bases teóricas | 5 |
| 1.2.1. Accidente Bothrópico | 5 |
| <i>1.2.1.1. Definición</i> | <i>5</i> |
| 1.2.2. Familia Piperaceae..... | 5 |
| 1.2.3. Género Piper..... | 6 |
| 1.2.4. Piper umbellatum L..... | 7 |
| <i>1.2.4.1. Descripción Botánica</i> | <i>7</i> |
| <i>1.2.4.2. Distribución y hábitat.....</i> | <i>8</i> |
| <i>1.2.4.3. Aplicaciones.....</i> | <i>8</i> |
| <i>1.2.4.4. Composición química</i> | <i>9</i> |
| 1.2.5. Ácido hialurónico | 10 |
| 1.2.6. Veneno..... | 10 |
| <i>1.2.6.1. Clasificación de los venenos de las serpientes</i> | <i>12</i> |
| 1.2.7. Bothrops atrox (Serpiente “Equis” de Ecuador)..... | 13 |
| <i>1.2.7.1. Etimología</i> | <i>13</i> |
| <i>1.2.7.2. Hábitat.....</i> | <i>14</i> |
| 1.2.8. Efectos de la mordida | 14 |
| 1.2.9. Suero antiofídico..... | 14 |

CAPÍTULO II

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 2. MARCO METODOLÓGICO | 16 |
|------------------------------------|-----------|

| | | |
|------------------|---|-----------|
| 2.2. | Identificación de material vegetal | 16 |
| 2.3. | Recolección de material vegetal..... | 16 |
| 2.4. | Materiales, equipos y reactivos..... | 17 |
| 2.4.1. | <i>Material vegetal</i> | 17 |
| 2.4.2. | <i>Material biológico.....</i> | 17 |
| 2.4.3. | <i>Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados</i> | 17 |
| 2.5. | Métodos y Técnicas..... | 20 |
| 2.5.1. | <i>Recolección, lavado y secado de la especie vegetal</i> | 20 |
| 2.5.2. | <i>Control de calidad de la droga cruda.....</i> | 20 |
| 2.5.2.1. | <i>Determinación del contenido de humedad</i> | 20 |
| 2.5.2.2. | <i>Determinación de cenizas totales.....</i> | 21 |
| 2.5.2.3. | <i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....</i> | 22 |
| 2.5.2.4. | <i>Determinación de cenizas solubles en agua.....</i> | 22 |
| 2.5.3. | <i>Tamizaje fitoquímico</i> | 23 |
| 2.5.3.2. | <i>Ensayo de Sudan.....</i> | 25 |
| 2.5.3.3. | <i>Ensayo de Dragendorff, Mayer, Wagner.....</i> | 26 |
| 2.5.3.4. | <i>Ensayo de Baljet.....</i> | 26 |
| 2.5.3.5. | <i>Ensayo de Borntrager.....</i> | 26 |
| 2.5.3.6. | <i>Ensayo de Liebermann-Burchard.....</i> | 27 |
| 2.5.3.7. | <i>Ensayo de catequinas</i> | 27 |
| 2.5.3.8. | <i>Ensayo de resinas</i> | 27 |
| 2.5.3.9. | <i>Ensayo de Fehling</i> | 28 |
| 2.5.3.10. | <i>Ensayo de la espuma</i> | 28 |
| 2.5.3.11. | <i>Ensayo del cloruro férrico.....</i> | 28 |
| 2.5.3.12. | <i>Ensayo de Shinoda.....</i> | 29 |
| 2.5.3.13. | <i>Ensayo de antocianidinas.....</i> | 29 |
| 2.5.3.14. | <i>Ensayo de mucílagos</i> | 29 |
| 2.5.3.15. | <i>Ensayo de principios amargos y astringentes</i> | 30 |
| 2.5.4. | <i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico.....</i> | 30 |
| 2.5.4.1. | <i>Requisitos organolépticos.....</i> | 30 |
| 2.5.4.2. | <i>Determinación de densidad relativa.....</i> | 30 |
| 2.5.4.3. | <i>Índice de refracción.....</i> | 30 |
| 2.5.4.4. | <i>Medición de pH</i> | 31 |
| 2.5.4.5. | <i>Determinación de sólidos totales.....</i> | 31 |
| 2.5.5. | <i>Proceso de preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de Piper umbellatum L.</i> | 31 |
| 2.5.6. | <i>Determinación de Flavonoides Totales mediante método colorimétrico.....</i> | 31 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.5.7. | <i>Determinación de Fenoles Totales mediante el método Folin-Ciocalteu</i> | 32 |
| 2.5.8. | <i>Determinación de la inhibición de la hialuronidasa</i> | 32 |
| 2.5.8.1. | <i>Inhibición de la hialuronidasa bovina</i> | 32 |
| 2.5.8.2. | <i>Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra (Naja naja) y veneno de (Bothrops atrox)</i> | 34 |

CAPÍTULO III

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3. | MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS. | 36 |
| 3.1. | Ensayos de Control de calidad del material vegetal | 36 |
| 3.2. | Tamizaje Fitoquímico..... | 37 |
| 3.3. | Control de calidad de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper umbellatum</i> L. | 38 |
| 3.4. | Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu..... | 39 |
| 3.5. | Cuantificación de Flavonoides Totales | 40 |
| 3.6. | Evaluación <i>in vitro</i> de la Actividad inhibitoria de la hialuronidasa..... | 41 |
| 3.6.1. | <i>Inhibición de la hialuronidasa bovina</i> | 41 |
| 3.6.2. | <i>Inhibición de la hialuronidasa en los venenos de Naja naja y Bothrops atrox</i> ¡Error! <i>Marcador no definido.</i> | |
| 3.7. | Análisis Estadístico | 46 |
| | CONCLUSIONES | 51 |
| | RECOMENDACIONES | 52 |
| | BIBLIOGRAFÍA | |
| | ANEXOS | |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica de <i>Piper umbellatum</i> L. | 8 |
| Tabla 2-1: Dosis letal mínima en el hombre y dosis media inoculada de distintas serpientes venenosas..... | 11 |
| Tabla 3-1: Componentes químicos activos del veneno de los ofidios. | 12 |
| Tabla 4-1: Clasificación fisiopatológica de los venenos..... | 13 |
| Tabla 1-2: Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados..... | 17 |
| Tabla 2-2: Protocolo de tratamiento del extracto de la hojas de <i>Piper umbellatum</i> L. en el ensayo de inhibición de la hialuronidasa bovina. | 33 |
| Tabla 3-2: Protocolo de inhibición de la hialuronidasa del veneno cobra (<i>Naja naja</i>) y veneno de serpiente Equis (<i>Bothrops atrox</i>) a diferentes concentraciones del extracto de <i>Piper umbellatum</i> L. | 35 |
| Tabla 1-3: Resultados de los ensayos de control de calidad de las hojas de <i>Piper umbellatum</i> L. | 36 |
| Tabla 2-3: Tamizaje Fitoquímico de las hojas de <i>Piper umbellatum</i> L..... | 37 |
| Tabla 3-3: Control de Calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Piper umbellatum</i> L. | 38 |
| Tabla 4-3: Cuantificación de Fenoles Totales..... | 40 |
| Tabla 5-3: Cuantificación de Flavonoides Totales..... | 40 |
| Tabla 6-3: Porcentaje de Inhibición de la hialuronidasa bovina como consecuencia de la actividad del extracto..... | 41 |
| Tabla 7-3: Porcentaje de Inhibición de cada veneno por efecto del extracto..... | 42 |
| Tabla 8-3: Absorbancias en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra | 44 |
| Tabla 9-3: Absorbancias de inhibición del veneno de <i>Bothrops atrox</i> | 45 |
| Tabla 10-3: Test de Fisher | 46 |
| Tabla 11-3: Diferencias significativas entre las especies cobra y equis Test de Tukey..... | 46 |
| Tabla 12-3: Diferencias significativas en las concentraciones Test Tukey. | 46 |
| Tabla 13-3: Diferencias significativas de concentración en función de los tiempos de análisis de los venenos de serpientes Test Tukey..... | 47 |
| Tabla 14-3: Contrastes entre concentraciones para el veneno de serpiente Equis Test de Bonferroni..... | 47 |
| Tabla 15-3: Diferencias significativas de concentraciones del extracto Test de Bonferroni. | 48 |
| Tabla 16-3: Contrastes entre concentraciones para el veneno de la cobra Test de Bonferroni.. | 49 |
| Tabla 17-3: Diferencias significativas de concentraciones del extracto Test de Bonferroni | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1-1: Distribución geográfica de la familia Piperaceae..... | 6 |
| Figura 2-1: <i>Piper umbellatum</i> L. (Santa María) | 7 |
| Figura 3-1: Estructura del 4-nerolidilcatecol | 9 |
| Figura 4-1: Estructura del Ácido hialurónico | 10 |
| Figura 5-1: Especie <i>Bothrops atrox</i> | 13 |
| Figura 1-2: Punto de recolección de la <i>Piper umbellatum</i> L | 17 |
| Figura 2-2: Esquema para la extracción del material vegetal y la aplicación del Tamizaje Fitoquímico..... | 24 |
| Figura 3-2: Esquema de pruebas del extracto etéreo. | 24 |
| Figura 4-2: Esquema de pruebas del extracto alcohólico. | 25 |
| Figura 5-2: Esquema de pruebas del extracto acuoso..... | 25 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|---------------------|---|----|
| Gráfico 1-3: | Curva del % de Inhibición de la hialuronidasa bovina..... | 42 |
| Gráfico 2-3: | Curva del % inhibición de los venenos de la serpiente equis y cobra respectivamente..... | 43 |
| Gráfico 3-3: | Regresión cuadrática de segundo orden de las absorbancias de la inhibición de <i>Naja naja</i> | 44 |
| Gráfico 4-3: | Regresión cuadrática de segundo orden del veneno de las absorbancias de la hialuronidasa de <i>Bothrops atrox</i> | 45 |

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL.

ANEXO B: CONTROL DE CALIDAD DE LA ESPECIE VEGETAL.

ANEXO C: CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO.

ANEXO D: TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

ANEXO E: EXTRACTO LIOFILIZADO.

ANEXO F: CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES

ANEXO G: INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA BOVINA.

ANEXO H: VENENO LIOFILIZADO DE *Bothrops atrox*.

ANEXO I: GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE *Piperumbellatum* L.

ANEXO J: CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE *Piperumbellatum* L.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AH: Ácido Hialurónico

Art.: Artículo

M: Metros

Cm: Centímetros

Mm: Milímetros

mL: Mililitro

μL: Micro Litro

ppm: Partes por millón

mM: Milimol

M: Mol

pH: Potencial Hidrogeno

DMSO: Dimetil sulfóxido

USP: United States Pharmacopeal

g: Gramos

L: Litros

Kg: Kilogramos

MTRH: Ministerio de Trabajo y Recursos Humanos

OMS: Organización Mundial de la Salud

UV: Ultravioleta

FTEQ: Flavonoides totales expresados como miligramos equivalentes de quercetina

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la capacidad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de Santa María (*Piper umbellatum* L) sobre la hialuronidasa bovina y la presente en el veneno de algunas serpientes. Sus usos son tradicionales como antiinflamatorio, antifúngico, insecticida, antiveneno etc. y además como alimento. Para el estudio se usó las hojas secas, se realizó el control de calidad de estas y se obtuvo el extracto hidroalcohólico, que posteriormente fue liofilizado. En el tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides y terpenos; además, se empleó la espectrofotometría UV para la cuantificación de fenoles y flavonoides totales, métodos basados en la capacidad que tienen estos metabolitos en reaccionar frente a agentes oxidantes. La inhibición de la hialuronidasa se fundamenta en la cantidad de N-acetilglucosamina producida por el hialuronato de sodio. En el ensayo de inhibición de la hialuronidasa se utilizó el extracto a concentraciones de 25, 50, 100, 150, 250 y 1000 ppm, un blanco y un control de máxima actividad enzimática. Los resultados se obtuvieron por triplicado, en la inhibición de la hialuronidasa bovina se evidenció una inhibición del 81,7% a 150 ppm; mientras que, frente a los venenos de cobra (*Naja naja*) y serpiente Equis (*Bothrops atrox*) a 250 ppm se inhibió únicamente el 23,754% y 17,765% respectivamente. La diferencia en el porcentaje de inhibición puede deberse a factores como la variabilidad genética, cantidad de hialuronidasa y la edad de los reptiles. Es recomendable estudiar el efecto de esta especie vegetal sobre otras enzimas que forman parte del veneno de los ofidios.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <ACTIVIDAD INHIBITORIA>, <HIALURONIDASA BOVINA (Enzima)>, <N-ACETILGLUCOSAMINA>, <FENOLES>, <FLAVONOIDES>, <VENENO DE COBRA (*Naja naja*)>, <VENENO DE EQUIS (*Bothrops atrox*)>, <SANTA MARÍA (*Piper umbellatum* L.)>.



ABSTRACT

The research aimed to evaluate the inhibitory capacity of the hydro alcoholic extract of Santa Maria (*Piper umbellatum* L.) on bovine hyaluronidase and that present in the venom of some snakes. Its uses are traditional as an anti-inflammatory, anti-fungal, insecticide, anti-venom and also as food. For the study we used the dry leaves, we made the quality control of these and we obtained the hydroalcoholic extract, which was later lyophilized. In the phytochemical screening the presence of alkaloids, phenols, flavonoids, and terpenes was identified; besides, UV spectrophotometry was used for the quantification of phenols and total flavonoids methods, based on the capacity of these metabolites to react to oxidizing agents. The inhibition of hyaluronidase is based on the amount of N-acetylglucosamine produced by sodium hyaluronate. In the hyaluronidase inhibition test, the extract was used at concentrations of 25, 50, 100, 150, 250 and 1000 ppm, a target and control of maximum enzymatic activity. The results were obtained in triplicate, in the inhibition of bovine hyaluronidase an inhibition of 81,7% at 150 ppm was evidenced; while, against cobra (*Naja naja*) and snake Equis (*Bothrops atrox*) poisons at 250 ppm only 23,754% and 17,765% were inhibited respectively. The difference in the percentage of inhibition may be due to factors such as genetic variability, amount of hyaluronidase and age of the reptiles. It is recommended to study the effect of this plant species on other enzymes that are part of the ofidium venom.

Keywords: <BIOCHEMICAL>, <PHARMACOLOGY>, <INHIBITORY ACTIVITY>, <BOVINE HYALURONIDASE (Enzyme)>, <N-ACETYLGLUCOSAMINE>, <PHENOLS>, <FLAVONOIDS>, <COBRA VENOM (*Naja naja*)>, <EQUIS VENOM (*Bothrops atrox*)>, <SANTA MARIA (*Piper umbellatum* L.)>.



INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere al envenenamiento por mordedura de un ofidio como una enfermedad potencialmente mortal que suele ser el resultado de la inyección de una mezcla de diferentes toxinas (veneno). Los venenos de serpiente son una mezcla compleja de toxinas proteínicas y peptídicas que varían de una especie a otra, e incluso dentro de una misma especie. Las toxinas presentes en los venenos están adaptadas para interactuar con una gran variedad de dianas celulares en los organismos expuestos a ellas (WHO, 2017).

Se dictamina como un problema de salud pública y se calcula que cada año se producen cerca de 5,4 millones de mordeduras de serpiente en el mundo, lo que da lugar a unos 2,7 millones de envenenamientos, un promedio de 81.000 y 138.000 muertes y cerca de 400.000 amputaciones y otras discapacidades permanentes (Organización Mundial de la Salud, 2019).

Los animales y humanos son muy susceptibles al efecto biológico del veneno, este coctel de sustancias toxicas afecta a múltiples órganos y sistemas, causa hemorragias, alteraciones de la hemostasia, parálisis neuromuscular, necrosis tisular, miólisis (degeneración muscular), cardiotoxicidad, lesiones renales y trombosis (Soler y Rodriguez, 2006).

En el Ecuador constituye un importante problema de Salud Pública especialmente en zonas rurales y selváticas del país. La mayor incidencia de estos casos se registra en las zonas rurales con un incremento importante de casos durante los meses de enero a mayo, época de mayor precipitación en la región litoral y de mayo a agosto en la región amazónica (Meneses, 2011, pp. 67) (MSP, 2008).

Las personas más afectadas pertenecen a comunidades pobres y rurales de países tropicales y subtropicales que generalmente reportan poco acceso a la educación y a la atención sanitaria, convirtiéndolos así en la población de mayor vulnerabilidad. Un gran porcentaje de muertes y consecuencias graves por mordeduras de serpiente son prevenibles, el objetivo es lograr una mayor disponibilidad y accesibilidad a antídotos seguros y eficaces (OMS, 2017).

El suero antiofídico es el único medicamento biológico que neutraliza el veneno y es utilizado para el tratamiento de este tipo de accidentes. Se administra en las primeras 24 horas después de la mordida por vía intravenosa lenta (MSP, 2008, pp. 24)

Ecuador utiliza suero antiofídico polivalente, y el más frecuente es SAO-B (Suero Antiofídico Antiothrópico) de origen internacional, por lo tanto la actividad terapéutica esperada se podría ver afectada. Algunos sueros antiofídicos que Ecuador utilizaba anteriormente son: Antiothrópico VITAL y BUTANTÁN (Brasil), Polivalente Antiothrópico INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (Colombia) y Polivalente Antiothrópico, antilachésico y anticrotálico CLODOMIRO PICADO (Costa Rica) que hasta la actualidad este país sigue distribuyendo a nuestro territorio (MSP, 2008, pp. 25-25 ; MSP, 2017, pp. 57-58).

El 70% del territorio ecuatoriano tiene características tropicales y subtropicales, situación que permite el crecimiento y desarrollo de diversas especies: animales, vegetales y ofidios tanto venenosos como no venenosos (MSP, 2008).

El conocimiento tradicional de la gente que vive en las zonas tropicales y subtropicales del Ecuador nos lleva a desarrollar esta investigación, al conocer sus usos tradicionales. La gente del oriente ecuatoriano y sobretodo las comunidades selváticas que se encuentran aisladas y distantes a un centro de salud o a la medicina química, utilizan plantas nativas en sus curaciones en casos de picaduras de serpientes, su uso es una alternativa natural a la medicina convencional (Torre and Macía, 2008, pp. 17,23).

Un estudio llevado a cabo en el 2015 en la provincia de Los Ríos registra el uso de 33 plantas con finalidad medicinal; siendo las hojas las estructuras más utilizadas (87,9%) y la forma de preparación principal fue la infusión (66,7%), y la vía de administración más empleada fue la bebida (87,9%). Este estudio da a conocer que el conocimiento campesino sobre las especies nativas y sus usos en la medicina tradicional en áreas rurales ha ido disminuyendo progresivamente, de manera conjunta con el proceso de pérdida y de degradación de los ecosistemas naturales (Martínez, 2006; Paredes, Buenaño and Rodríguez, 2015, pp. 39-46).

El bioconocimiento atribuido a las comunidades ecuatorianas puede servir como base de investigación de nuevos fármacos y como desarrollo de la medicina tradicional en el país. Además, un informe presentado por el etnobotánico de la PUCEC concluye que de las 80 especies de plantas estudiadas el 28% tienen efectos medicinales comprobados y el 75% no tiene ningún tipo de estudio químico-farmacológico (El Comercio, 2016).

Estudios realizados sobre varias serpientes venenosas, han demostrado que la hialuronidasa no sólo aumenta la letalidad en la difusión de los venenos, sino que también daña el sitio de la mordedura, resultando en una morbilidad grave (Delgadillo *et al.*, 2013).

La familia Piperaceae es tropical, con algunos representantes en las zonas templadas, muy diversificada, es de muy fácil acceso para a población Costera u Oriental. En Ecuador hay 107 especies de plantas de esta familia botánica con uso medicinal. El género *Piper* consta de unas 800 especies de distribución pantropical. En Ecuador está ampliamente distribuido pero aún no se conoce el número exacto de especies (Vacas, 2017; Ulloa & Moller, 2016).

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluar la capacidad inhibitoria de la hialuronidasa del extracto hidroalcohólico de *Piper umbellatum* L.

Objetivos específicos

- Conocer los metabolitos secundarios presentes en Piperaceae mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar la concentración de flavonoides y fenoles totales en la especie vegetal por métodos colorimétricos.
- Definir la concentración del extracto con alta actividad inhibitoria.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Las plantas han jugado un papel fundamental en la vida del hombre, pues este las ha utilizado a través del tiempo para suplir muchas necesidades tales como alimento, medicina, vivienda y vestido, incluso en actos rituales y religiosos. El conocimiento sobre el uso de las plantas es una práctica tan antigua que viene desde los inicios de la misma existencia humana (Valois & Pinos, 2004; Martínez, 2006).

Ecuador por su alta diversidad biológica y cultural se ha constituido en uno de los países con un gran potencial en lo referente a la medicina tradicional, por lo que es importante establecer las formas de uso de cada planta y los beneficios curativos que brinda la medicina tradicional en las diferentes comunidades del país (Zambrano and Buenaño, 2015 pp. 98-109).

El estudio de bosques tropicales en el país ha adquirido importancia e interés en las últimas décadas en gran medida por la pérdida acelerada del conocimiento tradicional y a la degradación de los bosques. En Ecuador, los estudios de etnobotánica y plantas medicinales y han sido ampliados principalmente en la zona central andina y Amazonía, y consiste en la enumeración de las plantas que conoce y utiliza la gente local y/o la descripción de los sistemas tradicionales de salud en comunidades indígenas (Zambrano and Buenaño, 2015 pp. 98-109).

Las cinco familias con mayor número de especies de plantas medicinales son: Fabaceae, Rubiaceae, Piperaceae, Solanaceae, Asteraceae y Araceae, mientras tanto las provincias que usan en mayor número las plantas medicinales son: Esmeraldas (1039), Morona Santiago (1063), Pastaza (1075), Orellana (1096), Sucumbíos (1144), Pichincha (1496) y Napo (1659) (Zambrano and Buenaño, 2015 pp.98; Vacas, 2017 pp. 28).

En Brasil trabajadores de plantaciones utilizan como antídoto oral “Especifico Pessoa” contra el veneno de arañas y serpientes. En los ensayos realizados se presentó actividad del 100% de “Especifico Pessoa” que es producido y elaborado por el Laboratorio Frota del nordeste de Brasil. Su composición es herbal pero con exactitud no se sabe sobre la identidad botánica de las plantas con las que está preparado este producto, pero una planta llamada cabeza de negro

contiene cabenegrinas con actividad y reputación contra los venenos en la región (Camargo, Verrastro, & Dellacassa, 2014 pp. 39).

En cierta manera el hombre ha aprendido a convivir con su entorno con la fauna autóctona, así la población de las distintas zonas y regiones del país conoce como prevenir, actuar y tratar las mordeduras de serpientes (Pérez, Rojo and Vicente, 2008 pp. 102).

1.2. Bases teóricas

1.2.1. *Accidente Bothrópico*

1.2.1.1. *Definición*

Es ocasionado por serpientes del género *Bothrops*, en la actualidad se encuentra clasificado en varios géneros (MSP, 2008).

El veneno de estos ofidios provoca manifestaciones sistémicas y locales por su alta concentración de factores mio-necrotizantes y anti-coagulantes. En casos de demora del tratamiento o complicaciones el envenenamiento puede desenlazar en discapacidad o letalidad (MSP, 2017).

1.2.2. *Familia Piperaceae*

La familia Piperaceae se figura como una de las más diversas y complejas entre las angiospermas basales. No hay una definición del número de especies y géneros que la componen pero en la actualidad su filogenia y el modelo de diversidad floral está aún en controversia (Guillermo and Massuo, 2012).

Algunos autores, incluyen 14 géneros y aproximadamente 1950 especies, que son ampliamente distribuidas en ambos hemisferios (Fig. 1). Hay una mayor diversidad de la especie *Piper* en los trópicos americanos (700 spp.), seguido por el sur de Asia (300 spp.) (Jaramillo, 2015).

En Ecuador se encuentran los géneros *Sarcorrhachis*, *Peperomia*, *Trianaeopiper* y *Piper* con 441 especies más, y 134 especies endémicas propias de la región, mientras que Perú tiene 811 especies, de las cuales 528 se estima que son endémicas y Brasil cuenta con 479 especies (Guillermo y Massuo, 2012; Jaramillo, 2015).

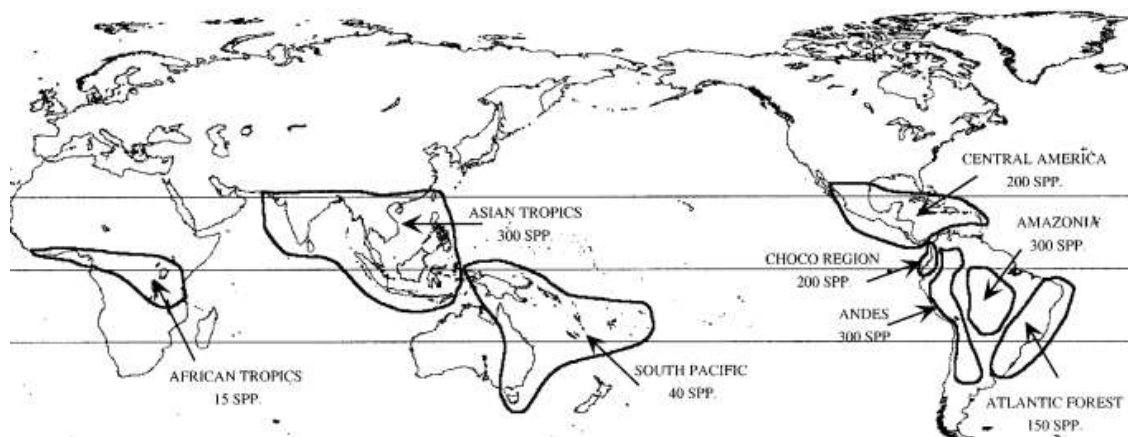


Figura 1-1: Distribución geográfica de la familia Piperaceae

Fuente: Jaramillo, 2015

La familia Piperaceae posee metabolitos secundarios como los fenilpropanoides, lignanos y neolignanos conocidos por sus actividades antitumorales, bactericidas, antifúngicas, anti PAF y anti HIV, amidas alifáticas y aromáticas agentes insecticidas, molusquicidas y alcaloides policétidos (Kato and Furlan, 2007 pp. 529-538; Guillermo and Massuo, 2012 pp. 50,51).

1.2.3. Género *Piper*

El género *Piper* es pantropical, alrededor del mundo hay al menos 2000 especies de estas, crecen en bosques húmedos en forma de hierbas, arbustos y lianas comunes en el sotobosque. Sin embargo, tienen importancia medicinal, comercial y económica tal es el caso de la especie *Piper nigrum* L. comúnmente conocida como pimienta negra usada como condimento culinario (Niño y Dorr, 2018; Guillermo y Massuo, 2012).

Existen otras especies medicinales consideradas por el hombre como remedios para aliviar dolores de pecho, estómago, afecciones hemorroidales e incluso bajar la fiebre, su uso se da como antiinflamatorio, también en el tratamiento del asma y bronquitis. Aunque poseen actividad fungicida e insecticida tienen baja actividad citotóxica y moderada actividad antiplasmodial (Guillermo y Massuo, 2012).

Este género está constituido comúnmente por amidas (isobutilamina, pirrolidina y piperidina), terpenos, alcaloides, flavonoides, neolignanos, lignanos, kawalactonas, butenólicos y epóxidos del ciclohexano. Una cualidad de este género es la presencia de aceites esenciales constituidos por sesquiterpenoides, fenilpropanoides y terpenoides (Celis and Mendoza, 2008 pp. 98; Pino and Melendez, 2015 pp. 302).

Las investigaciones realizadas en especies *Piper* relacionan su toxicidad y su efecto sinérgico contra los insectos. De hecho, estas especies al contener amidas representan una clase de productos naturales prometedores como pesticidas potenciales por su toxicidad contra una amplia diversidad de insectos y microorganismos (Kato and Furlan, 2007 pp. 529-538; Guillermo and Massuo, 2012 pp. 50,51).

1.2.4. *Piper umbellatum* L.

Piper umbellatum L., es una Piperaceae con una variedad de sinonimias, según el portal Trópicos es conocida también como: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., *Lepianthes umbellata* (L.) Raf., *Heckeria umbellata* (L.) Kunth., *Peperomia umbellata* (L.)



Figura 2-1: *Piper umbellatum* L. (Santa María)
Realizado por: Morales, Aracely, 2019

1.2.4.1. Descripción Botánica

Santa María es un arbusto perenne de hierba leñosa de 0,9 a 4 m de altura, con muchos tallos gruesos y suculentos que constituyen un grupo denso de un portainjerto leñoso, enraizándose en los nudos, sus raíces principales son carnosas en suelos pesados. Sus hojas alternas son circulares a reniformes (5–40 cm × 5–40 cm) de color verde oscuro en la parte superior y en la parte inferior grisáceo, márgenes enteros o crenulados y ápice redondeado, venación palmada hasta 15 venas, peciolo dilatado de 6,5 a 30 cm de largo (Da Silva et al., 2014; AFPD, 2008).

Las inflorescencias son de 5,5–15 cm de largo como espigas carnosas y blandas de 2 a 8 juntas sobre pedúnculos axilares 3-12 cm de largo y de 1-3 pedúnculos juntos, las flores son bisexuales y pequeñas con brácteas redondeadas de 0,5 a 0,8 mm de ancho. El Fruto es carnoso y globoso de color pardusco (Da Silva et al., 2014).

Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica de *Piper umbellatum* L.

| | |
|--------------------------|----------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Piperales |
| Familia | Piperaceae |
| Género | <i>Piper</i> |
| Especie | <i>umbellatum</i> |
| Nombre científico | <i>Piper umbellatum</i> L. |

Elaborado por: Morales, Aracely, 2019

Fuente: GBIF, 2019

1.2.4.2. *Distribución y hábitat*

Arbusto nativo neotropical, distribuido en América Central, Sur América (Amazonía) y las islas de las Indias Occidentales. Fue introducida en el sudeste de Asia y África. En la región Andina y Amazónica del Ecuador se presentan ejemplares en las provincias de Morona Santiago, Napo, Pastaza y Pichincha, a una elevación de 0-500, 500-1000, 1000-1500, 1500-2000 msnm (Da Silva et al., 2014; Tropicos, 2009)

1.2.4.3. *Aplicaciones*

Es ampliamente empleada en medicina popular por varios países. Las hojas se han utilizado en infusión para el tratamiento de enfermedades infecciosas e inflamatorias. Estudios previos han verificado que los extractos y compuestos puros derivados de distintas partes de *Piper umbellatum* tienen un amplio espectro de acciones farmacológicas como: actividades antibacterianas, antioxidantes, antifúngicas, antiaterogénicas, citotóxicas, analgésicas, antiinflamatorias, antipalúdicas, antileishmaniales, antitripanosómicas y también su capacidad

inhibitoria de la miotoxina producido por el veneno de serpientes del género *Bothrops* (Da Silva et al., 2014; Roersch, 2010).

Además de los usos medicinales que le otorgan a la planta, en Ecuador la comunidad Shuar la utiliza como condimento y alimento formando parte de la dieta diaria de la gente (se comen las hojas jóvenes e inflorescencias crudas, al vapor o hervidas), en regiones de Asia tropical las frutas se degustan como un manjar (Pohle y Reinhardt, 2004; Da Silva et al., 2014; Roersch, 2010).

1.2.4.4. Composición química

Estudios fitoquímicos realizados a *Piper umbellatum* han mostrado que poseen ciertos péptidos (en el aceite esencial principalmente), al igual que flavonoides, fenoles, alcaloides (Da Silva et al., 2014; Roersch, 2010).

Los flavonoides, al ser ingeridos, son metabolizados por la microflora intestinal y transformados a metabolitos activos. La etapa inicial es la hidrólisis de los glicósidos, luego la ruptura del anillo pirónico produciéndose moléculas pequeñas (ácidos fenólicos) que son metabolitos activo contra los venenos (Camargo, Verrastro, & Dellacassa, 2014 pp. 39).

El 4-nerolidilcatecol (potencial antioxidante quimiopreventivo, inhibe el efecto de los venenos) es considerado como el principal compuesto bioactivo presente en toda la planta. En un estudio realizado se aislaron algunos alcaloides bioactivos nuevos de las ramas, denominados piperumbellactamas y en las partes aéreas se encontró el N-benzoilmescalina también alcaloide (Roersch, 2010; Da Silva et al., 2014; PROTA4U, 2016).

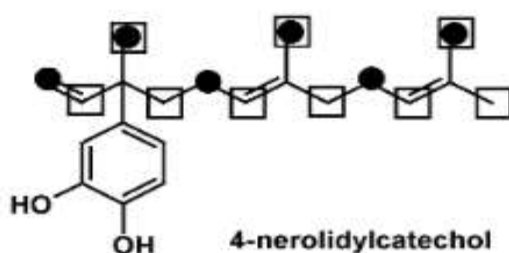


Figura 3-1: Estructura del 4-nerolidilcatecol
Fuente: Massuo J. Kato, and Maysa Furlan, 2007

1.2.5. *Ácido hialurónico*

El ácido hialurónico es un disacárido compuesto por D-ácido glucorónico y N- acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos, se encuentra presente en la matriz extracelular de los tejidos del cuerpo y vasos sanguíneos. Además, actúa como una barrera defensiva debido a la influencia de sus funciones celulares en la migración, adhesión y proliferación de glóbulos blancos (Espinoza *et al.*, 2015 pp. 41; Osorio-delgado *et al.*, 2017 pp. 248).

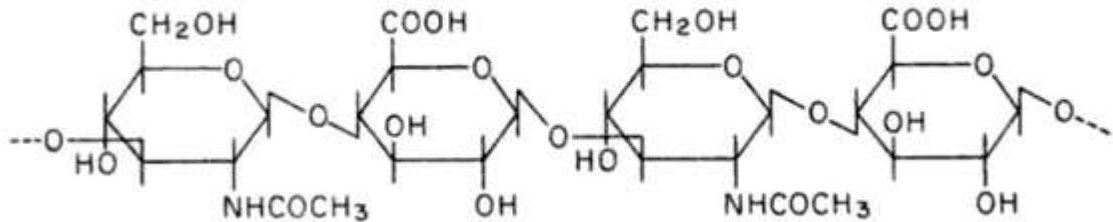


Figura 4-1: Estructura del Ácido hialurónico

Fuente: J. Eyzaguirre, 1975

El AH tiene la capacidad de lubricar y absorber agua por lo que se utiliza en distintas áreas como: en dermatología aporta hidratación, suavidad y firmeza de la piel, en ortopedia estabilidad mecánica de articulaciones, oftalmología lubricación, humectación y aumento de viscosidad, oncología contribuye a la curación de heridas por migración celular, etc. (Espinoza *et al.*, 2015).

La degradación del AH es provocada por las enzimas beta-D glucoronidasa, beta D-N-acetil-hexosaminidasa y hialuronidasa. La hialuronidasa hidroliza el AH y ocasiona arrugas en la piel produce menor viscosidad de los fluidos corporales y aumenta la permeabilidad de los tejidos conectivos (Espinoza *et al.*, 2015).

1.2.6. *Veneno*

El veneno es un tóxico producido por un animal que puede ser o no ingerido, pero es capaz de provocar toxicidad local, sistémica o ambas al ser administrado por vía parenteral (Ayres, 2000).

El veneno de los ofidios es un líquido ligeramente amarillento o transparente que a veces puede ser anaranjado o verdoso en ciertos crotalinos de los géneros *Trimeresurus* y *Bothrops* por la presencia de compuestos flavínicos. Sin embargo, también puede ser turbio y de consistencia siruposa debido a la presencia de mucinas y detritos celulares contenidos en suspensión (Valledor de Lozaya, 1994).

Una vez deshidratado tiene un aspecto quebradizo como de resina seca, de igual forma cambia su pH haciéndose más básico que el del plasma sanguíneo humano (Valledor de Lozaya, 1994).

El veneno puede llegar a causar trastornos fisiológicos en sus víctimas o presas mordidas. Los efectos se relacionan con la acción de las toxinas sobre los canales iónicos o receptores de las enzimas con acción catalítica, lo que ocasiona la desviación homeostática del sistema nervioso central y periférico, y los sistemas neuromotor, cardiovascular y sistemas de coagulación sanguínea. Así mismo, la necrosis tisular cerca de la picadura puede desencadenar secuelas permanentes, común en accidentes de *Bothrops* (Matioli et al., 2017).

La clasificación de venenos se realiza según su potencia en cuanto a la dosis letal mínima, o cantidad de veneno que es administrado y es capaz de matar a un animal de laboratorio en un lapso de 24 horas como se puede observar en la Tabla 2-1 (Torres Morera, 2002).

Tabla 2-1: Dosis letal mínima en el hombre y dosis media inoculada de distintas serpientes venenosas

| <i>Especie</i> | <i>Nombre común</i> | <i>Dosis media inoculada peso en seco, mg</i> | <i>Dosis letal mínima en el hombre, mg</i> |
|--------------------------------|--|---|--|
| <i>Ancistrodon contortrix</i> | Mocasin de cabeza de cobre | 40-60 | 380 |
| <i>Ancistrodon piscivorus</i> | Mocasin negra, de agua o de boca de algodón | 80-180 | 100 |
| <i>Bitis arietans</i> | Víbora de ariete o sopladora | 150-250 | 100 |
| <i>Bitis gabonica</i> | Víbora del Gabón | 350-650 | 60 |
| <i>Bothrops atrox</i> | "Barba amarilla" "Mapanare" "Caicaca" | 60-250 | 60 |
| <i>Bothrops bilineatus</i> | "Mapanare" verde "Jararucá" verde | 30-70 | 800 |
| <i>Bungarus caeruleus</i> | Búngaro común | 10-60 | 5 |
| <i>Calloselasma rhodostoma</i> | Mocasin de Malasia | 40-60 | 40 |
| <i>Crotalus adamanteus</i> | Crótalo diamantina Oriental (serpiente de cascabel) | 300-600 | 150 |
| <i>Crotalus atrox</i> | Crótalo diamantina Occidental (serpiente de cascabel) | 200-300 | 100 |
| <i>Crotalus durissus</i> | Crótalo de selva o tropical (serpiente de cascabel) | 40-130 | 40 |
| <i>Crotalus scutulatus</i> | Crótalo del desierto del Mohave (serpiente de cascabel) | 30-100 | 15 |
| <i>Daboia lebetina</i> | Víbora de Oriente | 60-150 | 70 |
| <i>Daboia russelli</i> | Víbora de Russell o daboia | 130-250 | 30 |
| <i>Dendroaspis polylepis</i> | Mamba negra | 50-100 | 10 |
| <i>Echis carinatus</i> | Víbora gariba | 15-40 | 5 |
| <i>Enhydrina schistosa</i> | Serpiente marina picuda | 7-20 | 1 |
| <i>Haemachatus haemachatus</i> | Cobra de collar o escupidora | 150-350 | 50 |
| <i>Lachesis muta</i> | "Bushmaster" "Señor de la selva" "Shushupe" "Cuaima piña" "Daya" "Sururucú" | 280-550 | 170 |
| <i>Microrus fulvius</i> | Serpiente de Coral | 5-15 | 15 |
| <i>Naja haje</i> | Cobra egipcia o áspid de Cleopatra | 150-350 | 25 |
| <i>Naja naja</i> | Cobra común áspid | 100-300 | 20 |
| <i>Notechis ater</i> | Serpiente tigre | 30-70 | 2 |
| <i>Trimeresurus popeorum</i> | Crótalos esmeralda y crótalos del bambú | 10-20 | 600 |
| <i>Trimeresurus wagleri</i> | Crótalo de Wagler | 60-90 | 200 |
| <i>Vipera ammodytes</i> | Víbora de nariz cornuda | 10-35 | 50 |
| <i>Vipera aspis</i> | Víbora áspid | 10-20 | 35 |
| <i>Vipera berus</i> | Víbora común o Europea | 10-20 | 25 |

Fuente: Torres Morera, Luis Miguel, 2002. p.1546.

Tabla 3-1: Componentes químicos activos del veneno de los ofidios.

| | |
|--|--|
| <p>Glucoproteínas Proteínas de alto peso molecular</p> | <p>Reacciones anafiláticas</p> |
| <p>Polipéptidos Neurotoxinas Cardiotoxinas y miotoxinas</p> | <p>Parálisis respiratoria Depresión cardiovascular</p> |
| <p>Enzimas Proteasas Fosfolipasa A Fosfomonoesterasa Fosfodiesterasa Exopeptidasa L-aminoacidooxidasa Nucleotidasa Ribonucleasa Desoxirribonucleasa Adenosín-trifosfatasa Nucleótido-pirofosfatasa Acetilcolinesterasa Hialuronidasa Colagenasa Elastasa</p> | <p>Hipotensión arterial Citólisis y hemólisis Citólisis y hemólisis Citólisis y hemólisis</p> <p>Disgregación tejido conectivo Disgregación tejido conectivo Disgregación tejido conectivo</p> |

Fuente: Valledor de Lozaya, Arturo, 1994. p.27.

Estas enzimas aceleran las reacciones químicas que fragmentan los enlaces químicos entre grandes moléculas. Por lo tanto, actúan en la descomposición de carbohidratos, fosfolípidos, nucleótidos y proteínas en el espécimen mordido, además de contribuir a la destrucción de glóbulos rojos, disminución de la presión arterial e inhibición de control muscular. La toxina polipeptídica produce muerte celular provocando la inhibición de las funciones celulares, esta proteína se encuentra constituida por 50 o menos aminoácidos (Dr. Jesús M. Jiménez Porras, 2015).

Las toxinas de un veneno pueden afectar a distintos órganos de tal modo que una fracción neurotrópica específica del veneno de una serpiente puede ocasionar efectos adversos en otros sistemas. Pero también es probable que los tóxicos contengan acciones farmacológicas más limitadas (Ayres, 2000).

1.2.6.1. Clasificación de los venenos de las serpientes

La clasificación fisiopatológica de los venenos va a depender de factores como: vía de inyección, dosis, tipo de animal envenenado, etc. (Jiménez Porras, 1994).

El veneno de los Elápidos e hidrófidos tienen efectos neurotóxicos (no produce lesiones locales, pero posee actividad miotóxica), los viperinos y crotálicos son hemotóxicos-citotóxicos (provoca extensas lesiones y hemorragias incoercibles). En la Figura 1-7 se muestra la clasificación fisiopatológica de los venenos de serpiente (Roodt et al., 2005; Valledor de Lozaya, 1994).

Tabla 4-1: Clasificación fisiopatológica de los venenos de ofidios venenosos.

| Venenos (grupo) | Familias, género o especies |
|------------------------------|--|
| Hemolítico y neurotóxicos | Crótalus de América del Sur (Cascabel) |
| Neurotóxicos y hemolíticos | Hidrofidae (Serpientes marinas) |
| Neurotóxicos y proteolíticos | Naja (Cobras) |
| Neurotóxicos | Micrurus, Micruroides y Bungarus |
| Proteolíticos y coagulantes | Vipera, Crotalus de América del Norte y Bothrops |

Fuente: Torres Morera, Luis Miguel, 2002. p.1547.

1.2.7. *Bothrops atrox* (Serpiente “Equis” de Ecuador)

Bothrops atrox fue descrita en 1758 por Linnaeus como *Coluber atrox*. Además de ser un componente importante ecológico *B. atrox* es una de las serpientes más venenosas y de gran importancia en la Amazonía desde el punto de vista de la morbilidad y mortalidad de personas (Oliveira, 2001; Camilo et al., 2018).

En Ecuador comúnmente se la denomina como serpiente Equis, en otros países se la llama Pitalala y Jergón, etc, esta serpiente es la responsable del mayor número de accidentes ofídicos en Sudamérica y también en nuestro país con un 70-80% de casos. En las tribus Waorani la mayor parte de gente adulta han sido mordidos por lo menos una vez (Pazmiño Gustavo, 2018; Oliveira, 2001; MSP, 2008).

1.2.7.1. Etimología

El origen de su nombre se deriva de las raíces griegas *Bothros* (fosa) y *ops* (cara), que hacen referencia a las fosetas termo receptoras que muestran estos vipéridos y del latín *atrox* (feroz) debido a su comportamiento agresivo (Camilo et al., 2018).



Figura 5-1: Especie *Bothrops atrox*

Fuente: Quiñones-Betancourt et al. 2018

Bothrops atrox es una especie principalmente nocturna, aunque esporádicamente se le ha observado activa durante el día. Generalmente para cazar a su presa utiliza el mecanismo de emboscada, rara vez emplea una búsqueda activa para capturar a sus presas (Camilo et al., 2018).

1.2.7.2. Hábitat

Se distribuye en la mayor parte del norte y sur de América, se encuentran en las selvas tropicales amazónicas está presente en países como Colombia, Brasil, Perú, Venezuela, Surinam, Guyana, Guayana Francesa, Bolivia y Ecuador. En Ecuador se ha registrado en las provincias de Pastaza, Sucumbíos, Orellana, Morona Santiago, Napo y Zamora Chinchipe (Pazmiño Gustavo, 2018).

Esta serpiente frecuenta áreas urbanas y cultivos con bosques tropicales, lluviosos, húmedos y montañosos bajos. Prefiere ambientes húmedos asociados a ríos, lagunas y arroyos. Los juveniles se localizan principalmente en arbustos de hasta 1,5 m, en cambio los adultos se encuentran en el suelo a veces en vegetación (Camilo et al., 2018; Oliveira, 2001).

1.2.8. Efectos de la mordida

Los pueblos indígenas cuyas tareas diarias incluyen la agricultura y la tala, están en riesgo permanente de mordedura de serpiente (Smalligan et al., 2004).

En humanos la mordedura de esta serpiente induce efectos locales como inflamación, hemorragia local, infección bacteriana y necrosis, así mismo produce efectos sistémicos que incluyen alteraciones en la coagulación de la sangre y diversos tipos de sangrado alejados del sitio de la mordedura. La infección bacteriana y necrosis puede causar pérdida de las partes (Malaque y Gutierrez, 2016; Smalligan et al., 2004).

Los venenos bothrópico y lachésico son histolíticos con peligro de graves hemorragias es decir, causan incoagulabilidad sanguínea (Silva, 1989).

1.2.9. Suero antiofídico

El suero antiofídico es una solución purificada de inmunoglobulinas adquiridas a través del plasma equino inoculados con el veneno específico de una serpiente. De esta manera el suero hiperinmune contiene anticuerpos específicos contra el veneno que se ha usado en la inoculación por lo tanto, así, neutraliza de manera específica las toxinas del veneno circulante en el cuerpo (MSP, 2017 pp. 57).

En el mercado se encuentra disponible en forma líquida conservado en refrigeración de 2-8°C y en polvo liofilizado que es almacenado a una temperatura no mayor a 30°C. Se debe administrar en las primeras 24 horas después de la mordida y únicamente por vía endovenosa. Éste puede producir reacciones alérgicas al ser un producto de tipo biológico (MSP, 2017;2008).

La producción de suero antiofídico en Ecuador fue autosustentable y cubrió con las necesidades sanitarias de la población. Sin embargo, hoy en día el país ya no produce suero antiofídico que en años atrás el responsable de producir fue el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical Leopoldo Izquieta Pérez (IN-HMT-LIP), que después de un decreto ejecutivo escindió en el 2012 en la Agencia de Registro, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) y el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) encargado de la producción de biológicos (Iturralde, 2016).

El país se ha convertido depende de importaciones de países como Costa Rica y Estados Unidos para satisfacer las necesidades del estado. Ahora solo se importa suero antiofídico polivalente (*Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*) de una sola empresa privada costarricense aunque con serpientes diferentes del territorio ecuatoriano, pero el problema está en que las serpientes de Ecuador pueden tener toxinas que las serpientes del otro país no tengan (Iturralde, 2016).

Desde el 2015-2017 cerca de 42 883 frascos de suero antiofídico se han administrado, y un promedio anual de 14 278 frascos (El Comercio, 2018).

Según el código del Trabajo Art. 435 menciona que los dueños o propietarios de empresas agrícolas que realicen actividades al aire libre en zonas tropicales o subtropicales del país se encuentran obligados a disponer un mínimo de 6 dosis de suero antiofídico y el instrumental necesario para aplicar en caso de mordeduras de serpientes (MTRH, 1997).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

El trabajo investigativo se basó en la actividad inhibitoria de la hialuronidasa del extracto hidroalcohólico de *Piper umbellatum* L. *in vitro* a diferentes concentraciones: 25, 50, 100, 150, 250, y 1000 ppm.

2.1. Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en los diferentes laboratorios de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH como: Laboratorio de Productos Naturales, Laboratorio de Química Analítica y Análisis Instrumental.

2.2. Identificación de material vegetal

Para la identificación de la especie vegetal se tomó muestras del espécimen en el lugar de recolección, las cuales fueron presentadas al Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo a cargo del Ing. Jorge Caranqui.

2.3. Recolección de material vegetal

Las muestras de la especie vegetal fueron recolectadas en el Parque Etnobotánico Omaere del cantón Puyo, provincia de Pastaza, aproximadamente a una altitud de 925 msnm, con sus coordenadas geográficas GDM.

Latitud: -1,4743

Altitud: -77,9956



Figura 1-2: Punto de recolección de la *Piper umbellatum* L
Fuente: GPS, 2019

2.4. Materiales, equipos y reactivos

2.4.1. *Material vegetal*

Hojas de *Piper umbellatum* L.

2.4.2. *Material biológico*

Veneno de cobra (*Naja naja*) y serpiente Equis (*Bothrops atrox*).

2.4.3. *Lista de materiales, equipos y reactivos utilizados*

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

| Control de Calidad de materia prima (especie vegetal) | | |
|--|-----------------------------|-----------------------|
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Cápsulas | Molino Arthur H. Thomas C.O | Ácido clorhídrico 10% |
| Reverbero | Balanza analítica | Agua destilada |
| Pinzas para cápsula | Estufa | |
| Vasos de precipitación | Mufla | |
| Embudo | Sonicador | |
| Papel filtro | Sorbona | |
| Trípode | | |
| Crisoles de porcelana | | |

| Tamizaje Fitoquímico | | |
|--|---|--|
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Tubos de ensayo Pinzas para tubo Gradilla Papel filtro Pipetas de 1 mL, 5 mL, 10 mL Frasco ámbar de 250 mL Reverbero Vasos de precipitación Embudo Trípode Pera de succión | Sorbona | Reactivo de Sudan III Reactivo de Baljet Reactivo de Dragendorff Reactivo de Mayer Reactivo de Wagner Reactivo de Liebermann-Buchari Reactivo de FeCl ₃ Reactivo de Catequinas Reactivo de Fehling Reactivo de Borntrager Cloruro de sodio Carbonato de sodio Ácido clorhídrico concentrado Ácido clorhídrico 1% Ácido sulfúrico concentrado Hidróxido de sodio 5% Etanol Éter etílico Alcohol amílico Anhídrido sulfúrico concentrado Cinta de magnesio metálico Agua destilada Cloroformo |
| Control de Calidad del Extracto Hidroalcohólico | | |
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Cápsulas de porcelana Frasco ámbar 1L Piseta Pinza para cápsula Picnómetro Probeta 100mL Papel filtro Vasos de precipitación Reverbero | Balanza analítica Mufla pH-metro Refractómetro | Agua destilada Etanol |

| Liofilización del extracto hidroalcohólico | | |
|--|---|--|
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Algodón higroscópico Balón esmerilado de 250 mL Espátula Embudo simple Frasco ámbar de 1L Manguera Papel filtro Trípode | Balanza analítica Bomba de presión al vacío Congelador Liofilizador Thermo MicroModulyo Dryer Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath Sonicador Branson 2510 | Agua destilada Etanol |
| Cuantificación de Fenoles y Flavonoides (espectro UV) | | |
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Balones de aforo de 25mL y 100mL Cronómetro Micropipeta de 100 µL y 1000 µl Papel aluminio Pipeta de 2mL, 5mL y 10mL Piseta Puntas amarilla y azules Tubos de ensayo Vaso de precipitación | Balanza analítica Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolución 220 Vórtex mixer MRC S1-100 | Agua destilada Carbonato de Calcio saturado Hidróxido de sodio 1M Nitrato de sodio 5% Tricloruro de aluminio 10% Reactivo de Folin-Ciocalteu |
| Determinación de inhibición de la Hialuronidasa | | |
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Cronómetro Espátula Gradilla Micropipeta automática de 50µL, 100µL y 1000µL. Pipeta volumétrica de 1mL y 10mL Puntas amarillas y azules Tubos de ensayo Reverbero | Baño maría Balanza analítica Espectro UV pH-metro Vortex | Agua destilada Agua bidestilada LAVETEC Ácido acético glacial Ácido clorhídrico 10N Buffer acetato 0,1M Borato de sodio 0,2M Cloruro de calcio 12,m5M Dimetilsulfóxido 5% Hidróxido de sodio 0,4M Hialuronato de sodio Solución de hialuronidasa bovina 3900 U/mL |

| Determinación de inhibición de la Hialuronidasa del veneno de cobra (<i>Naja naja</i>) y veneno de serpiente Equis (<i>Bothrops atrox</i>) | | |
|---|-----------------------------------|---|
| Materiales | Equipos | Reactivos |
| Cronómetro Espátula Gradilla Micropipeta automática de 20 µL, 50µL y 250µL Puntas amarillas y azules Tubos de ensayo | Estufa Espectro UV pH-metro | Agua bidestilada LAVETEC Ácido hialurónico Buffer acetato Cloruro de sodio 0,15N Solución salina Solución de veneno de cobra <i>Naja naja atra</i> Solución de veneno de serpiente Equis <i>Bothrops atrox</i> |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

2.5. Métodos y Técnicas

2.5.1. *Recolección, lavado y secado de la especie vegetal*

Para la investigación se seleccionó las hojas maduras de *Piper umbellatum* L. se recolectó en una funda plástica, se retiró todas las impurezas mediante un lavado con agua. Para el secado, las hojas fueron sometidas a una temperatura de 40°C en la estufa por un determinado tiempo, luego se trituro en el molino Arthur H. Thomas C.O y se almacenó en un lugar fresco y seco libre de humedad (Miranda, 2006).

2.5.2. *Control de calidad de la droga cruda*

Para garantizar la seguridad, precisión y eficacia de los resultados se realizaron los ensayos por tres réplicas (Miranda, 2006).

2.5.2.1. *Determinación del contenido de humedad*

El deterioro de la droga cruda puede estar atribuido a una hidrólisis producida por el crecimiento de hongos e insectos por la presencia de agua en exceso en la materia vegetal. La determinación del contenido de humedad se realizó mediante un método gravimétrico que permite medir el contenido de agua presente en la especie vegetal.

Procedimiento:

Se pesó $2g \pm 0.5mg$ de materia prima triturada en una cápsula de porcelana previamente tarada, luego se transfirió la cápsula a la estufa con una temperatura de $105^{\circ}C$ durante 3 horas. Posteriormente la cápsula se colocó en el desecador y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo se pesó y nuevamente se ubicó en la estufa por una hora, repitiéndose así el mismo proceso de pesado hasta obtener masa constante (Miranda, 2006).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

$\%H$ = pérdida de peso por desecación (%).

M = masa de la cápsula vacía (g).

M_1 = masa de la materia vegetal (g).

M_2 = masa de la cápsula más la materia vegetal (g).

100= factor matemático.

2.5.2.2. *Determinación de cenizas totales*

Determina el contenido total de los minerales o de la parte inorgánica que contiene la droga cruda, eliminando los compuestos orgánicos existentes.

Procedimiento:

Se pesó $2g \pm 0.5mg$ de la droga triturada en un crisol de porcelana previamente tarada, la muestra se calentó y se carbonizó en un reverbero, aproximadamente a $700^{\circ}C$ se incineró en una mufla durante 2 horas hasta obtener un polvo blanco. Después de haber transcurrido este tiempo se enfrió en un desecador a temperatura ambiente y se pesó. El proceso se repitió hasta llegar a peso constante (Miranda, 2006).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

$\%C$ = cenizas totales en base hidratada.

M = masa de crisol vacío (g).

M_1 = masa de crisol con la muestra (g).

M_2 = masa de crisol con la ceniza (g).

100= factor matemático.

2.5.2.3. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Determina el contenido de compuestos insolubles en ácido clorhídrico.

Procedimiento:

Se añadió 3 mL de ácido clorhídrico 10% a las cenizas totales obtenidas en la prueba anterior. Con un vidrio reloj se tapó el crisol y se sometió a un baño de agua hirviente durante 10 minutos. Además, el vidrio reloj se lavó con 5 mL de agua caliente y se unió al contenido del crisol. Inmediatamente se filtró y se lavó el residuo con agua caliente, después se colocó 2 gotas de nitrato de plata 0.1M hasta tener ausencia de cloruros. El filtrado con el residuo se colocó en la estufa a 105°C por un determinado tiempo, se transfirió al crisol y se pasó a la mufla por dos horas a 700°C. Posteriormente, se trasladó a un desecador por 15 minutos y luego se pesó. Se repitió el proceso hasta obtener peso constante (Miranda, 2006).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

%B= cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M= masa del crisol vacío (g)

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

M₂= masa del crisol con la ceniza (g).

100= factor matemático.

2.5.2.4. *Determinación de cenizas solubles en agua*

Determinación del material inorgánico.

Procedimiento:

Se añadió 15 mL de agua a las cenizas totales obtenidas en la prueba anterior, se tapó con un vidrio reloj y se dejó en un baño de agua hirviente durante 5 minutos. Posterior a esto, se filtró la solución con papel filtro. El residuo contenido en el papel filtro es colocado en el crisol inicial el cual se carboniza y se incinera en la mufla a 700°C durante 2 horas. Inmediatamente el crisol se colocó en el desecador hasta enfriar a temperatura ambiente y se pesó enseguida. Se procuró repetir el proceso hasta obtener masa constante (Miranda, 2006).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

%Ca= cenizas solubles en agua.

M= masa del crisol vacío (g).

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

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

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

100= factor matemático.

2.5.3. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es la etapa inicial de investigación fitoquímica, identifica de forma cualitativa los metabolitos primarios y secundarios de una planta (Miranda, 2006).

2.5.3.1. Elaboración de extractos para el tamizaje fitoquímico.

Se pesó 40 g de droga vegetal desecada y pulverizada y se le añadió 100 mL de solvente, de esta forma se procedió a la extracción de metabolitos secundarios afines a los diferentes solventes. La parte de la planta analizada fue sometida a tres extracciones continuas, con solventes de polaridad en sentido creciente como: hexano, etanol y agua. El proceso se llevó a cabo de acuerdo al esquema de la Figura 2-2 (Miranda, 2006).

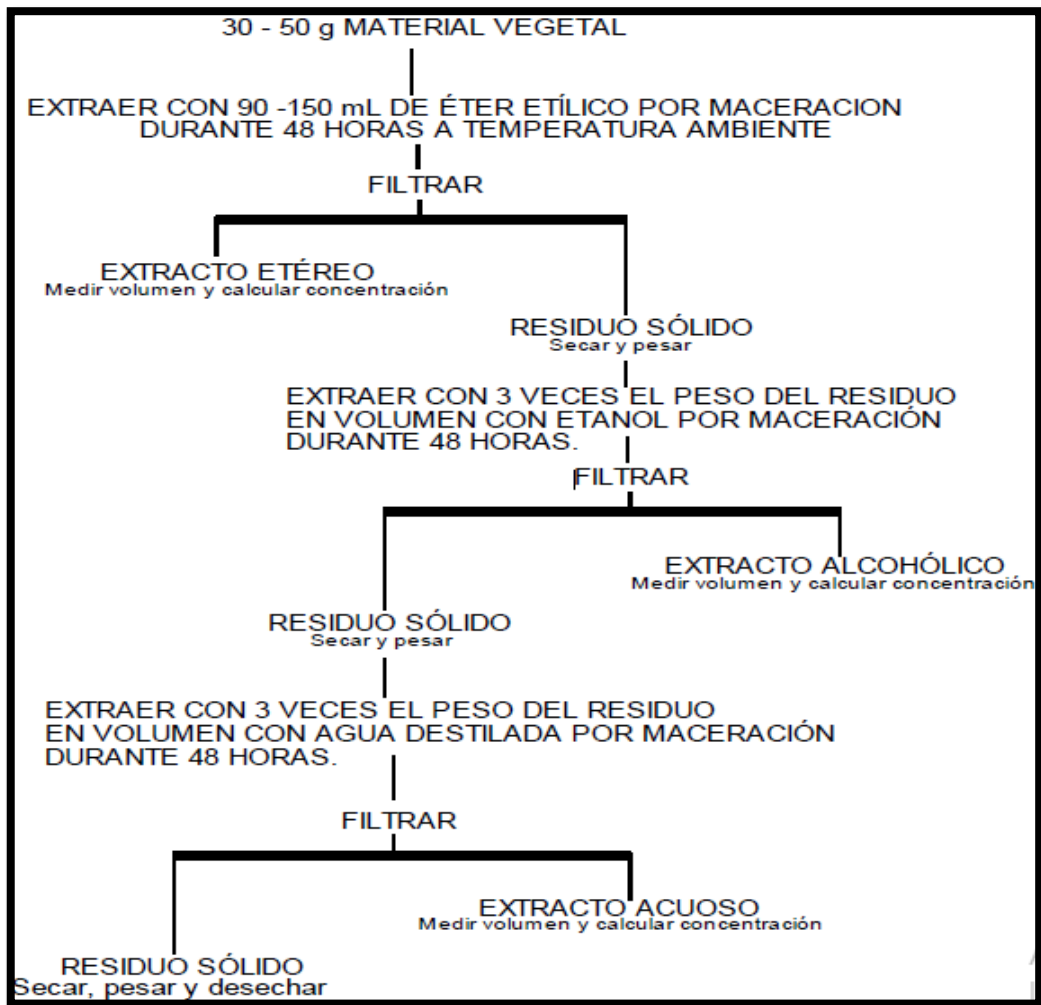


Figura 2-2: Esquema para la extracción del material vegetal y la aplicación del Tamizaje Fitoquímico.

Fuente: Miranda, 2006

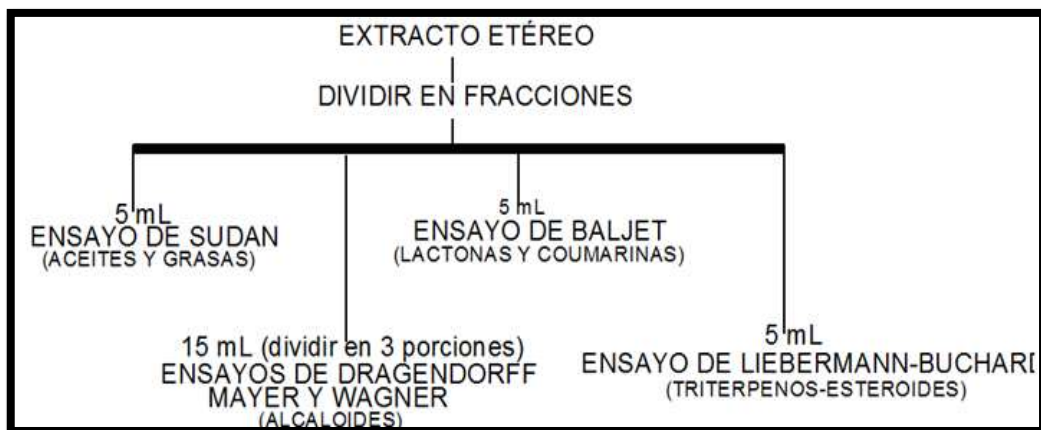


Figura 3-2: Esquema de pruebas del extracto etéreo.

Fuente: Miranda, 2006

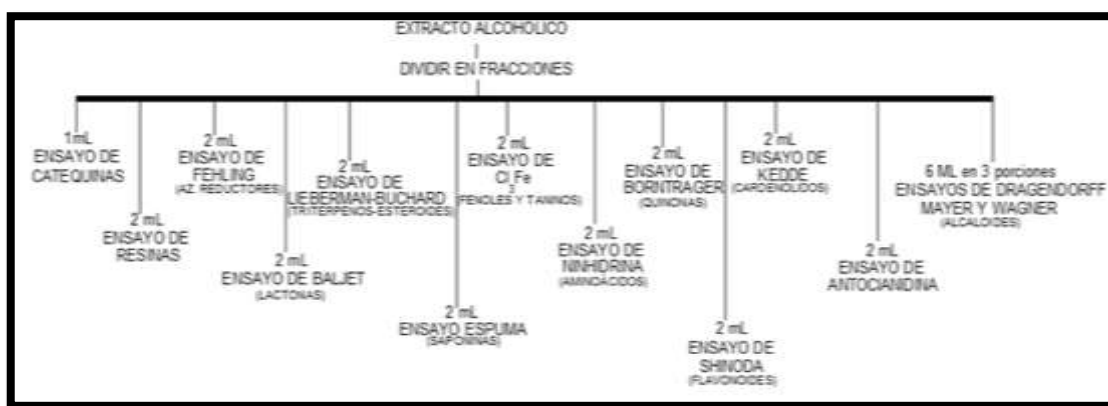


Figura 4-2: Esquema de pruebas del extracto alcohólico.

Fuente: Miranda, 2006



Figura 5-2: Esquema de pruebas del extracto acuoso.

Fuente: Miranda, 2006

2.5.3.2. *Ensayo de Sudan*

Esta prueba da a conocer la presencia de compuestos grasos.

Procedimiento:

En un tubo de ensayo con la muestra del extracto etéreo se añadió 1 mL del reactivo de Sudan III, se calentó a baño maría hasta la total evaporación del solvente.

Resultados positivos:

El ensayo se considera positivo si hay la presencia de gotas o una película de color rojo en las paredes del tubo o en el líquido restante (Miranda, 2006).

2.5.3.3. *Ensayo de Dragendorff, Mayer, Wagner*

Estos ensayos revelan la presencia de alcaloides de un extracto.

Procedimiento:

- Extracto hexánico: Se evaporó el solvente en un baño de agua hirviente y al residuo restante se añadió 1mL de HCl 1%.
- Extracto alcohólico y acuoso: Al extracto se añadió 1 gota de HCl concentrado, se calentó paulatinamente y se enfrió hasta llegar a su acidificación.

Posterior a la acidificación de cada extracto:

- Reactivo de Dragendorff: Se agregó 3 gotas de reactivo.
- Reactivo de Mayer: Se incorporó una pequeña cantidad de cloruro de sodio, se agitó y se filtró. Por último, se adicionó de 2 a 3 gotas de reactivo al filtrado.
- Reactivo de Wagner: Se añadió 3 gotas de reactivo.

Resultado positivo:

- Opalescencia: (+)
- Turbidez definida: (++)
- Precipitado coposo: (+++) (Miranda, 2006).

2.5.3.4. *Ensayo de Baljet*

Este ensayo permite evidenciar la presencia de cumarinas y también compuestos con grupo lactónico en su estructura.

Procedimiento:

- Extracto hexánico: Se evaporó el solvente en baño de agua hirviente y se adicionó 1mL de reactivo.
- Extracto alcohólico: Se colocó 1mL de reactivo.

Resultado positivo:

- Color rojo: (++)
- Precipitado rojo: (+++) (Miranda, 2006).

2.5.3.5. *Ensayo de Borntrager*

Este ensayo sirve para revelar la presencia de quinonas.

Procedimiento:

El extracto al no tener como solvente cloroformo, se calentó hasta evaporar el solvente, luego el residuo se diluyó en 1mL de cloroformo. Posteriormente se adicionó 1mL de NaOH 5% se agitó vigorosamente hasta su homogenización y se dejó reposar unos minutos hasta su separación.

Resultado positivo:

Fase (superior) acuosa alcalina

- Color rosado o rojo: Ensayo positivo.
- Coloración rosada: (++)
- Coloración roja: (+++) (Miranda, 2006).

2.5.3.6. *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Este ensayo permite determinar la presencia de triterpenos y/o esteroides.

Procedimiento:

Muestra sin cloroformo: El solvente de la muestra se evaporó en baño maría y el residuo se diluyó en 1 mL de cloroformo. Se colocó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló. Las gotas (2 o 3) de ácido sulfúrico concentrado se dejaron caer por las paredes del tubo con precaución

Resultado positivo:

- Color rosado-azul (muy rápido): (+)
- Color verde intenso (visible rápidamente): (++)
- Color oscuro-negro (final de la reacción) (+++) (Miranda, 2006).

2.5.3.7. *Ensayo de catequinas*

Este ensayo permite descubrir la presencia de catequinas.

Procedimiento:

Del extracto alcohólico se tomó una gota con un capilar y se colocó en un papel filtro, sobre la mancha producida en el papel se añadió una solución de carbonato de sodio.

Resultado positivo:

Se considera positiva una mancha de color verde carmelita a la luz UV (Miranda, 2006).

2.5.3.8. *Ensayo de resinas*

Este tipo de ensayo permite detectar resinas.

Procedimiento:

Se colocó 2 mL de muestra alcohólica en 10 mL de agua destilada.

Resultado positivo:

- Precipitado: Positivo

2.5.3.9. *Ensayo de Fehling*

Este ensayo permite mostrar la presencia de azúcares reductores.

Procedimiento:

- Muestra de extracto sin agua: el solvente del extracto se evaporó en baño maría.
- El residuo sobrante se disolvió en 1.2 mL de agua.
- Después se añadió 2 mL del reactivo de Fehling y se calentó suavemente en baño de agua por un periodo de 5 a 10 minutos.

Resultado positivo:

- Color rojo: Positivo
- Precipitado rojo: Positivo (Miranda, 2006).

2.5.3.10. *Ensayo de la espuma*

Este ensayo permite determinar saponinas (esteroideal y triterpénica).

Procedimiento:

- Alícuota en alcohol: Se tomó una alícuota del extracto y se diluyó en 5 veces su volumen en agua.
- A continuación se agitó vigorosamente la mezcla durante 5 a 10 minutos.

Resultado positivo:

Si la espuma tiene 2 mm de altura y perdura por más de 2 minutos la prueba se considera positiva (Miranda, 2006).

2.5.3.11. *Ensayo del cloruro férrico*

Esta prueba permite determinar la presencia de compuesto fenólico y taninos.

Procedimiento:

- Extracto alcohólico: Se añadió 3 gotas de tricloruro férrico 5%.
- Extracto acuoso (taninos): Se adicionó acetato de sodio y 3 gotas de una solución de tricloruro férrico 5%.

Resultado positivo:

- Color rojo-vino: Compuestos fenólicos en general.
- Color verde intenso: Taninos de tipo pirocatecólicos.
- Color azul: Taninos de tipo pirogalotánicos (Miranda, 2006).

2.5.3.12. *Ensayo de Shinoda*

Este tipo de ensayo permite revelar la presencia de flavonoides.

Procedimiento:

- La muestra alcohólica se disolvió en 1 mL de HCl concentrado y se anexó un pedazo de cinta de magnesio metálico.
- Se dejó reposar 5 minutos hasta que finalice la reacción.
- Posterior a esto, se añadió 1 mL de alcohol amílico y se agitó, luego se esperó hasta que se separen las fases.

Resultado positivo:

Positivo: El alcohol amílico se colorea de color (intenso) amarillo, naranja, carmelita o rojo (Miranda, 2006).

2.5.3.13. *Ensayo de antocianidinas*

Este ensayo sirve para revelar la presencia del grupo del flavonoides.

Procedimiento:

- Muestra etanólica: Por un periodo de 10 minutos se calentó 2 mL de extracto con 10 mL de HCl concentrado.
- Se dejó enfriar y se colocó 2 mL de alcohol amílico, se agitó fuerte y se dejó reposar hasta que las fases se separen.

Resultado positivo:

En la fase amílica se presenta una coloración roja a marrón resultante de un ensayo positivo (Miranda, 2006).

2.5.3.14. *Ensayo de mucílagos*

Esta prueba ayuda a determinar la presencia de mucílagos en el extracto.

Procedimiento:

A una temperatura de entre 0-5°C se enfría una muestra del extracto.

Resultado positivo:

La muestra se torna gelatinosa (Miranda, 2006).

2.5.3.15. *Ensayo de principios amargos y astringentes*

Para llevar a cabo este ensayo se tomó 1 gota del extracto acuoso se saboreó y se reconoció el sabor de cada principio (Miranda, 2006).

2.5.4. **Control de calidad del extracto hidroalcohólico**

2.5.4.1. *Requisitos organolépticos*

Para esta prueba se degustó el extracto así se logró definir características como olor, sabor, color y aspecto (Miranda, 2006).

2.5.4.2. *Determinación de densidad relativa*

Para la determinación de la densidad relativa se usó un picnómetro. Se pesó el picnómetro vacío luego se añadió la muestra de extracto almacenada a 25°C por 15 minutos y se pesó. Posteriormente se lavó, se secó, se colocó agua destilada a 25°C y se pesó (Miranda, 2006).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

M= Peso de picnómetro vacío.

M₁= Peso de picnómetro con muestra del extracto.

M₂= Peso de picnómetro con agua.

2.5.4.3. *Índice de refracción*

Esta prueba se realizó en el refractómetro, con una pipeta se colocó una gota del extracto sobre el prisma del equipo y se enfocó la luz que incide sobre el mismo (Miranda, 2006).

2.5.4.4. *Medición de pH*

Para la medición del pH se usó un pH-metro digital (Miranda, 2006).

2.5.4.5. *Determinación de sólidos totales*

Para realizar este ensayo se taró una cápsula de porcelana en la cual se colocó 5 mL de extracto hidroalcohólico y se evaporó en un baño de agua. A continuación la cápsula se colocó en la estufa a una temperatura de 105°C por 3 horas, posteriormente se dejó enfriar en el desecador a temperatura ambiente, se repitió el proceso hasta obtener peso constante (Miranda, 2006).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

ST= Sólidos totales de la muestra.

P= Masa de la cápsula tarada vacía.

Pr= Masa de la cápsula con residuo.

V= Volumen de alícuota añadida.

2.5.5. *Proceso de preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de Piper umbellatum L.*

Para la preparación del extracto hidroalcohólico, se pesó y se colocó en un frasco ámbar de 1L 100g de droga cruda de *Piper umbellatum L.* y se añadió el solvente etanol al 50%, se dejó macerar durante 72 horas con agitaciones suaves en el transcurso del día. Después de algunas horas de maceración, el extracto se colocó en el sonicador por 30 minutos. Posteriormente, se filtró el extracto y se llevó al rotavapor para su concentración, como producto se obtuvo una solución sin alcohol, la cual se filtró nuevamente. Finalmente se liofilizó el extracto con el uso de nitrógeno líquido para mantenerlo congelado durante todo el proceso hasta obtener un polvo seco libre de humedad.

2.5.6. *Determinación de Flavonoides Totales mediante método colorimétrico*

En el ensayo de determinación de flavonoides totales se inició tomando una alícuota de la muestra o de la solución estándar, se colocó 4 mL de agua destilada y 0.3 mL de Nitrito de Sodio al 5% a tiempo cero. Se cronometró 5 minutos. Al término del tiempo se añadió 0.3 mL de AlCl₃ al 10% se vortizó y se dejó reposar en completa oscuridad por 5 minutos. Después

se añadió 2mL de NaOH 1M y se homogenizó. Por último, la lectura de las absorbancias se realizó a 510 nm (Manoj, 2016).

2.5.7. *Determinación de Fenoles Totales mediante el método Folin-Ciocalteu*

Para el ensayo de cuantificación de fenoles totales se tomó una alícuota de la solución muestra o estándar en un balón aforado de 25mL, al instante se añadió 15mL de agua destilada y 1.25mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó reposar 8 minutos y se agregó 3.75mL de Carbonato de Sodio al 7.5% se homogenizó y se aforó con agua destilada. Se vortizó durante 1 minuto y se puso bajo sombra en completa oscuridad por 2 horas. Finalmente la lectura se realizó a una longitud de onda de 765 nm (Rover y Brown, 2013).

2.5.8. *Determinación de la inhibición de la hialuronidasa*

Para la evaluación inhibitoria de la hialuronidasa del extracto hidroalcohólico (50%) de *Piper umbellatum* L se siguió dos tipos de ensayos.

2.5.8.1. *Inhibición de la hialuronidasa bovina*

La prueba se fundamenta en la cuantificación de N-acetilglucosamina liberada del hialuronato de sodio, el procedimiento de detalla a continuación:

- Se tomó 50 µL de hialuronidasa bovina (disuelta en buffer acetato 0.1M pH 3.6) en un tubo de ensayo.
- En el mismo tubo de ensayo se añadió 50 µL de la solución preparada con el extracto de las hojas de *Piper umbellatum* L a diferentes concentraciones: 25, 50, 100, 150, 250, y 1000 ppm que previamente son disueltas con dimetilsulfóxido al 5%.
- Esta mezcla se sometió a incubación en baño maría durante 20 minutos a 37°C, al término del tiempo se añadió 50 µL de cloruro de calcio 12.5 mM (para activar a la enzima) y se dejó incubar nuevamente en baño maría por un lapso de 20 minutos a 37°C.
- Posteriormente se agregó 250 µL de hialuronato de sodio (1.2 mg/ml) en la mezcla y se incubó por 40 minutos a 37°C.
- Al concluir este periodo de incubación se añadió 50 µL de Hidróxido de sodio 0.4M y 100 µL de borato de sodio 0.2M, se vortizó y se sometió a un baño de agua hirviente por 3 minutos.
- Se enfrió inmediatamente en un chorro de agua fría y se agregó 1.5 mL de p-dimetilaminobenzaldehído (4g de p-dimetilaminobenzaldehído disueltos en 50 mL de ácido

clorhídrico 10N con 350 mL de ácido acético glacial) y se incubó durante 20 minutos a 37°C hasta el desarrollo de color.

- La lectura de la absorbancia se realizó a 585nm en un espectrofotómetro, los resultados se expresan como la cantidad de N-acetilglucosamina liberada (Liyanaarachchi et al., 2018; Süntar et al., 2012).

Ecuación de cálculo:

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

Donde:

Ac= Absorbancia del control

As= Absorbancia de la muestra de ensayo a diferentes concentraciones

Tabla 2-2: Protocolo de tratamiento del extracto de la hojas de *Piper umbellatum* L. en el ensayo de inhibición de la hialuronidasa bovina.

| Inhibición de la hialuronidasa bovina | | | | | | | | |
|---|--------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|---|
| BLANCO | CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD | Hojas | | | | | | REACTIVOS |
| | | 25 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 150 ppm | 250 ppm | 1000 ppm | |
| 50µL | | | | | | | | Buffer acetato pH 3,6 |
| | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | Hialuronidasa bovina en buffer acetato pH 3,6 |
| 50µL | 50µL | | | | | | | DMSO 5% |
| | | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | Concentraciones de extracto en DMSO 5% |
| Incubación durante 20 minutos a 37°C | | | | | | | | |
| 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | CaCl2 12,5Mm |
| Incubación durante 20 minutos a 37°C | | | | | | | | |
| | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | Hialuronato de sodio |
| Incubación durante 40 minutos a 37°C | | | | | | | | |
| 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | NaOH 0,4M |
| 100µL | 100µL | 100µL | 100µL | 100µL | 100µL | 100µL | 100µL | Borato de sodio 0.2M |
| Baño de agua hirviendo durante 3 minutos exactos y enfriar inmediatamente | | | | | | | | |
| 1.5mL | 1.5mL | 1.5mL | 1.5mL | 1.5mL | 1.5mL | 1.5mL | 1.5mL | P-dimetilaminobenzaldehído |
| Incubación durante 20 minutos a 37°C | | | | | | | | |
| Lectura de absorbancias a 585nm | | | | | | | | |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

2.5.8.2. *Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra (Naja naja) y veneno de (Bothrops atrox)*

- Se diluyó 100 µg de veneno de cobra en 20 µL de solución salina y se incubó a 37°C con 50 µg de ácido hialurónico en 250 µL de buffer acetato a 0,2M (pH 5) contenidos en cloruro de sodio 0,15N.
- El material vegetal liofilizado se disolvió en DMSO 5% como en el ensayo anterior.
- La lectura de las absorbancias se realizaron a una longitud de onda de 585nm en un espectrofotómetro.
- La actividad de inhibición es expresada en milimoles de N-acetilglucosamina liberada/minutos/mg de proteína (Süntar et al., 2012).

Ecuación de cálculo

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

Donde

Ac= Absorbancia del control

As= Absorbancia de la muestra de ensayo en diferentes concentraciones

Tabla 3-2: Protocolo de inhibición de la hialuronidasa del veneno cobra (*Naja naja*) y veneno de serpiente Equis (*Bothrops atrox*) a diferentes concentraciones del extracto de *Piper umbellatum* L.

| Inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra <i>Naja naja</i> y veneno de serpiente equis <i>Bothrops atrox</i> | | | | | | | | |
|---|--------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|--|
| BLANCO | CONTROL MÁXIMA ACTIVIDAD | Hojas | | | | | | REACTIVOS |
| | | 25 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 150 ppm | 250 ppm | 1000 ppm | |
| 250µL | | | | | | | | Buffer acetato 0,2M pH 5 |
| | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | Veneno de cobra o veneno de serpiente equis en solución salina |
| | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | 250µL | Ácido hialurónico en buffer acetato pH 5 0.2M contenidos en NaCl 0,15N |
| | | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | 50µL | Concentraciones de extracto en DMSO 5% |
| 50µL | | | | | | | | DMSO 5% |
| Incubación a 37°C | | | | | | | | |
| Lectura de absorbancias a 585nm | | | | | | | | |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Ensayos de Control de calidad del material vegetal

Los ensayos de control de calidad de la droga vegetal se realizaron por triplicado obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 1-3: Resultados de los ensayos de control de calidad de las hojas de *Piper umbellatum* L.

| PARÁMETRO | HOJAS DE <i>Piper umbellatum</i> L. | ESPECIFICACIONES USP# 35 LÍMITES DE REFERENCIA |
|-------------------------------|-------------------------------------|---|
| HUMEDAD (%) | 4,46±0,057 | Hasta 14% |
| CENIZAS TOTALES (%) | 10,21±0,042 | Hasta 12% |
| CENIZAS SOLUBLES EN AGUA (%) | 5,6±0,070 | Hasta 7% |
| CENIZAS INSOLUBLES EN HCL (%) | 3,31±0,042 | Hasta 5% |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

Un exceso de agua en la droga puede desencadenar en el crecimiento microbiano y puede desarrollar la presencia de hongos e hidrólisis. En la tabla 3-1 se muestra el 4,46% de humedad de la especie vegetal seleccionada, el porcentaje se encuentra dentro de los parámetros establecidos según la farmacopea USP 35, contribuyendo al control de calidad de la muestra.

Según la USP 35 en el contenido cenizas totales es permitido hasta un 12%, por lo tanto, el resultado obtenido de 10,21% se encuentra dentro del límite establecido. Este control permite determinar el contenido de materia extraña presente en la droga cruda y los minerales que presenta en su órgano vegetal.

La determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico determina la cantidad de arena o sílice en la droga vegetal, en el ensayo se obtuvo un 3,1% de contenido. En la determinación de cenizas solubles en agua se obtuvo un 5,6%. En base a la farmacopea, el resultado de los dos ensayos se encuentra dentro del rango especificado.

3.2. Tamizaje Fitoquímico

Tabla 2-3: Tamizaje Fitoquímico de las hojas de *Piper umbellatum* L.

| ENSAYO | METABOLITO IDENTIFICADO | EXTRACTO | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|----------|------------|--------|
| | | HEXÁNICO | ALCOHÓLICO | ACUOSO |
| SUDÁN | Grasas | + | N/A | N/A |
| BALJET | Lactonas y cumarinas | ++ | + | N/A |
| DRAGENDORFF | Alcaloides | + | ++ | +++ |
| MAYER | Alcaloides | - | ++ | +++ |
| WAGNER | Alcaloides | + | ++ | ++ |
| LIEBERMAN – BURCHARD | Triterpenos y esteroides | +++ | +++ | N/A |
| CATEQUINAS | Catequinas | N/A | - | N/A |
| RESINAS | Resinas | N/A | - | N/A |
| FEHLING | Azúcares | N/A | + | + |
| COLORURO FÉRRICO | Compuestos fenólicos | N/A | ++ | + |
| ESPUMA | Saponinas | N/A | - | + |
| BORNTRAGER | Quinonas | N/A | + | N/A |
| SHINODA | Flavonoides | N/A | + | + |
| ANTOCIANIDINAS | Secuencias de grupos de flavonoides | N/A | + | N/A |
| MUCÍLAGOS | Polisacáridos | N/A | N/A | - |
| PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES | | N/A | N/A | + |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

(+): Presencia, (-): Ausencia

En la tabla 2-3 se observa la presencia de metabolitos como: grasas, cumarinas, lactonas, alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares, compuestos amargos y saponinas. Estos metabolitos pueden ser los responsables de las actividades biológicas que se le atribuyen a la planta.

Las especies del género *P. hispidium*, *P. auritum*, *P. aduncum*, *P. sanctum*, *P. amalago*, *P. crocatum* y *P. callosum* contienen triterpenos y flavonoides las que le dan actividad antiinflamatoria, razón por la cual se emplean las especies vegetales que los contienen como anticancerígenos, antiinflamatorios, antisépticos, antidiabéticos etc., efectos atribuidos posiblemente a sus propiedades antioxidantes. Además los flavonoides tienen acción quelante de metales (cobre y hierro) al eliminar las especies reactivas de oxígeno, dado que pueden producir un radical más potente. En estudios realizados de actividad antibacteriana contra *Pectobacterium carotovorum* demostraron que los monoterpenos provocan daños en la membrana lipídica tanto funcionales como estructurales en la membrana, interactuando e induciendo cambios de polaridad así provoca la ruptura y liberación del material del interior de la bacteria (Kunth *et al.*, 2018, p. 85-86).

Los polifenoles tienen actividad antioxidante e inflamatoria que se le atribuye a *Piper auritum* contenidos en las hojas, estos están asociados al tratamiento de enfermedades ocasionadas por el estrés oxidativo que provoca un mal funcionamiento produciendo cambios a nivel celular que puede desarrollar en patología (enfermedades neurodegenerativas, cáncer, inflamación, etc.) (Kunth *et al.*, 2018, p. 85).

Los alcaloides presentes en la planta son los que le confieren actividad antibacteriana, además la presencia de saponinas regularmente son precursoras de detergentes.

Los metabolitos identificados muestran un uso potencial en el tratamiento de enfermedades ya que la mayor parte de componentes identificados se le atribuyen como agentes terapéuticos, debido a sus particulares estructuras químicas.

3.3. Control de calidad de extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper umbellatum* L.

Tabla 3-3: Control de Calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Piper umbellatum* L.

| Parámetro | Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Piper umbellatum</i> L. |
|---------------------------------------|---|
| CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS | |
| Olor | Alcohólico aromático |
| Color | Verde intenso |
| Aspecto | Turbio |
| Sabor | Amargo ligeramente astringente |

| CARACTERÍSTICAS FÍSICO – QUÍMICAS | |
|-----------------------------------|-------------|
| Índice de refracción | 1,364 |
| pH | 6,11 |
| Densidad relativa | 0,9090 g/mL |
| Sólidos totales (%) | 5,813% |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

En la tabla 3-3 se presentan las características organolépticas del extracto propias de la especie vegetal y del solvente utilizado para los ensayos.

Dentro de sus características fisicoquímicas como en el ensayo de índice de refracción se obtuvo como resultado 1,364, valor menor en comparación al agua, esto debido a la presencia de sustancias en suspensión en el extracto. El pH de extracto fue de 6,11, ligeramente ácido dada la presencia de varios metabolitos presentes en la solución alcohólica.

Se obtuvo el 0,9090 g/mL en la densidad relativa siendo mayor a la densidad del solvente empleado (etanol de 0,789 g/mL) y, menor a la densidad del agua 1 g/mL también usado en la elaboración del extracto, así se evidencia la presencia de sustancias presentes en el extracto.

Según la farmacopea el porcentaje debe ser mayor a 1,20 en sólidos totales, el resultado fue de 5,813% encontrándose dentro del rango establecido, este resultado asegura que el extracto contiene una gran cantidad de metabolitos de importancia.

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

Para la cuantificación de Fenoles Totales se empleó el método Folin-Ciocalteu, teniendo como estándar el ácido gálico para la obtención de una curva de calibración.

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

Tabla 4-3: Cuantificación de Fenoles Totales.

| EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO | FENOLES TOTALES | |
|-----------------------------|---|--|
| | mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco | g Equivalentes de Ácido Gálico/100g de extracto seco (%EQFT) |
| <i>Piper umbellatum L.</i> | 14,51±0,11 | 1,451±0,011 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

En la tabla se puede observar que 14,51 mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco, equivalen a 1,451 g Equivalentes de Ácido Gálico/100g de extracto seco (%EQFT) contenidos en el extracto de *Piper umbellatum L.* Torres (2018) en su investigación obtuvo un porcentaje de 1,449±0,012 de flavonoides, cuyo valor comparado se asemeja a los resultados de esta investigación, las pequeñas diferencias posiblemente se deba a la diferencia de especies vegetales.

Los polifenoles poseen una variedad terapéutica como antiinflamatorios, quimioprotectores, cicatrizantes etc., son de gran importancia a nivel farmacológico.

3.5. Cuantificación de Flavonoides Totales

Para la cuantificación de Flavonoides totales se empleó el método colorimétrico de tricloruro férrico. La solución estándar usada en el ensayo fue la quercetina con la cual se realizó la curva de calibración.

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

Tabla 5-3: Cuantificación de Flavonoides Totales.

| EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO | FLAVONOIDES TOTALES | |
|-----------------------------|--|--|
| | mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco | g Equivalentes de Quercetina/100g de extracto seco (%EQFT) |
| <i>Piper umbellatum L.</i> | 14,49±0,09 | 1,449±0,009 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

La cuantificación de Flavonoides totales se aprecia en la tabla anterior, con un valor de 14,49 mg Equivalentes de Quercetina/g de extracto seco, equivalen a 1,449g Equivalentes de Quercetina /100g de extracto seco (%EQFT) contenidos en el extracto de *Piper umbellatum L.* Se ha encontrado en estudios anteriores que flavonoides son los responsables de la actividad inhibitoria de la hialuronidasa, ya que en una investigación refiere que los flavonoides que

tengan en la estructura dobles enlaces en C1-C2 con grupos hidroxilo que no estén sustituidos en posiciones 5,7,4 con el grupo cetona en la posición 4 (Pilco, Vinueza y Sánchez, 2018).

Además, la composición de los metabolitos presentes en la planta varía; debido a condiciones y factores externos como: clima, luz, agua, humedad, tipo de suelo, nutrientes, etc.

3.6. Evaluación *in vitro* de la Actividad inhibitoria de la hialuronidasa

3.6.1. Inhibición de la hialuronidasa bovina

Tabla 6-3: Porcentaje de Inhibición de la hialuronidasa bovina como consecuencia de la actividad del extracto.

| TIPO DE EXTRACTO | CONCENTRACIÓN ppm | INHIBICIÓN % |
|--|-------------------|--------------|
| EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Piper umbellatum L.</i> | 25 | 3,54 |
| | 50 | 41,27 |
| | 100 | 71,90 |
| | 150 | 81,77 |
| | 250 | 80,00 |
| | 1000 | 15,19 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

En la tabla 6-3 se muestra que la concentración de 150 ppm presenta mayor porcentaje de inhibición, obteniéndose un 81,77% de inhibición seguido del 80% con la concentración de 250 ppm y el 71,90% con la concentración de 100 ppm siendo los valores más cercanos al valor máximo de inhibición. Mientras que a 25ppm se obtiene un porcentaje del 3,54% y el 15,19% se alcanza a los 1000 ppm de concentración del extracto hidroalcohólico. Por lo tanto, se puede observar que el rango con actividad inhibitoria esta entre los 100 y 250 ppm.

Estudios realizados (Torres, 2018) señalan que la actividad inhibitoria es baja cuando los metabolitos aún no ocupan de manera completa todos los sitios activos, o a concentraciones altas cuando los sitios activos tienden a saturarse por la acumulación de los compuestos. Los fenómenos señalados están regidos por la cinética enzimática.

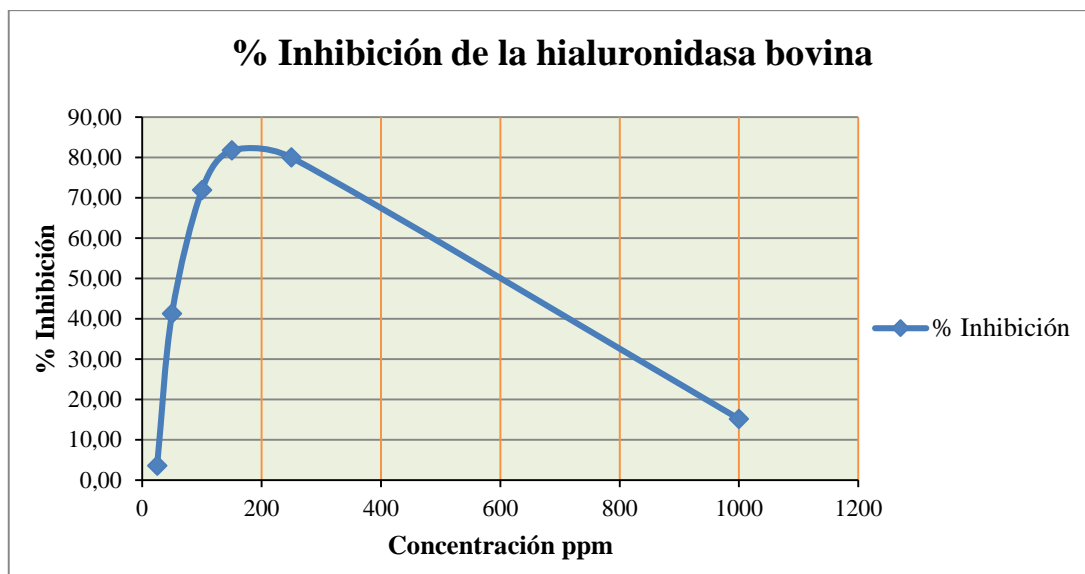


Gráfico 1-3: Curva del porcentaje de inhibición de la hialuronidasa bovina.
Realizado por: Morales, Aracely, 2019

En la gráfica 1-3 se presenta la curva de la capacidad inhibitoria de la hialuronidasa bovina analizada a distintas concentraciones. Se puede apreciar como la curva asciende a menor concentración hasta llegar a su punto máximo del 81,77% y empieza a descender a mayor concentración. Torres (2018) en su investigación con *Piper peltatum* obtuvo el 81,139% de inhibición de la hialuronidasa bovina a una concentración de 250 ppm al comparar las dos investigaciones se determina que el género *Piper* presenta una alta actividad inhibitoria.

3.6.2. Inhibición de la hialuronidasa en los venenos de *Naja naja* y *Bothrops atrox*

Tabla 7-3: Porcentaje de Inhibición de cada veneno por efecto del extracto.

| TIPO DE EXTRACTO | CONCENTRACIÓN ppm | % INHIBICIÓN VENENO | |
|--|----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | <i>Naja naja</i> | <i>Bothrops atrox</i> |
| EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Piper umbellatum L.</i> | 25 | 11,730 | 3,725 |
| | 50 | 13,490 | 4,585 |
| | 100 | 14,370 | 4,871 |
| | 150 | 16,422 | 15,759 |
| | 250 | 23,754 | 17,765 |
| | 1000 | 15,249 | 7,450 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

En la tabla 7-3 se observa que la inhibición de la hialuronidasa de *Naja atra* aparentemente es mayor que la de *Bothrops atrox*. En la inhibición del veneno de cobra se presentó una concentración de 250 ppm con una inhibición del 23,754% y al comparar con la inhibición de *Piper Peltatum* a una concentración de 6,25 ppm presento 40,16% habiendo una diferencia significativa. En la serpiente equis a 250 ppm se obtiene una inhibición de 17,765% y al comparar con la otra especie *P. peltatum* su máxima inhibición se dio a 12,5ppm con 24,07%. La diferencia de inhibición en ambas plantas puede deberse a la cantidad de metabolitos activos presentes en cada planta. Las dos especies de Piperaceae no superan el 50% de inhibición en ambos venenos (Torres, 2018).

La liberación de N-acetilglucosamina se produce cuando el ácido hialurónico se pone en contacto con la enzima hialuronidasa desenlazando la reacción.

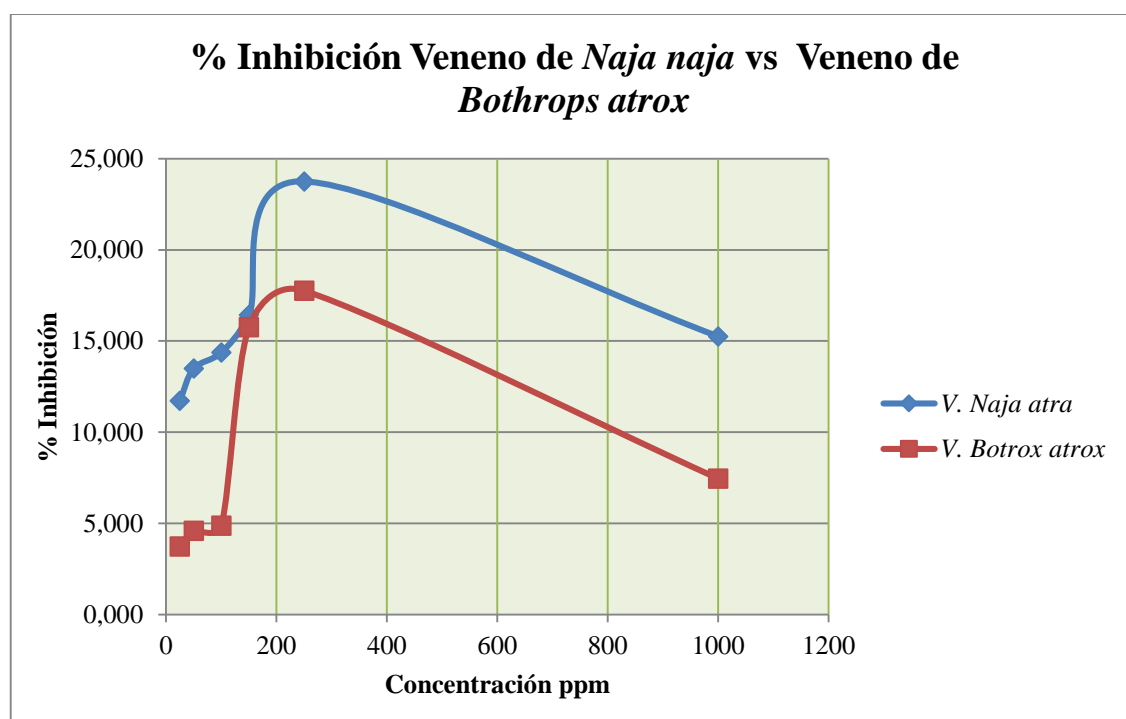


Gráfico 2-3: Curva del porcentaje de inhibición de los venenos de la serpiente equis y cobra respectivamente.

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

Al analizar la gráfica 2-3 se obtiene una curva con los resultados de la inhibición de la hialuronidasa de los venenos. Las curvas de ambos venenos se aprecia que siguen el mismo sentido que la gráfica 1-3 que a muy baja o muy alta concentración la inhibición descende, observando que el extracto tiene un mínimo efecto en ambos venenos menores al 50%.

Tabla 8-3: Absorbancias en la inhibición de la hialuronidasa del veneno de cobra.

| TIEMPO SEG | MAXIMA ACTIVIDAD | 25 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 150 ppm | 250 ppm | 1000 ppm |
|---------------|---------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-------------|
| 0 | 0,026 | 0,026 | 0,025 | 0,026 | 0,025 | 0,023 | 0,026 |
| 30 | 0,027 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,025 | 0,026 |
| 60 | 0,028 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,026 |
| 90 | 0,03 | 0,027 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,024 | 0,026 |
| 120 | 0,032 | 0,028 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,024 | 0,027 |
| 150 | 0,033 | 0,028 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0,023 | 0,027 |
| 180 | 0,033 | 0,028 | 0,028 | 0,026 | 0,026 | 0,023 | 0,027 |
| 210 | 0,033 | 0,028 | 0,028 | 0,026 | 0,026 | 0,023 | 0,026 |
| 240 | 0,033 | 0,028 | 0,028 | 0,028 | 0,026 | 0,023 | 0,026 |
| 270 | 0,033 | 0,028 | 0,028 | 0,028 | 0,026 | 0,023 | 0,026 |
| 300 | 0,033 | 0,028 | 0,028 | 0,028 | 0,026 | 0,023 | 0,026 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

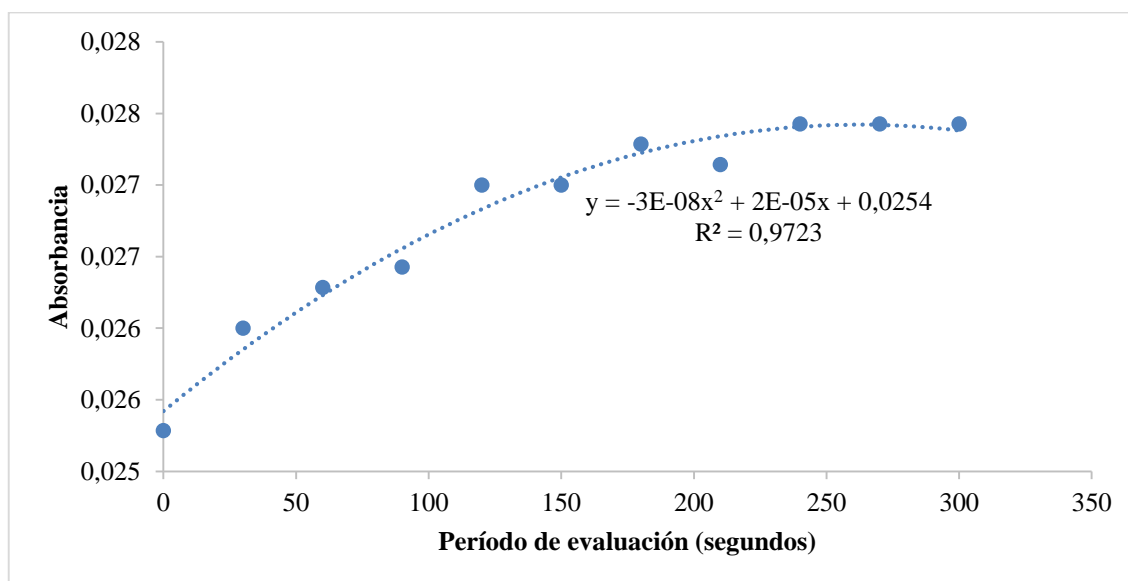


Gráfico 3-3: Regresión cuadrática de segundo orden de las absorbancias de la inhibición de *Naja naja*.

Realizado por: Aracely Morales, 2019

La absorbancia de la hialuronidasa del veneno de cobra relacionado significativamente al tiempo de evaluación, el 97,23% está relacionado por el tiempo habiendo una regresión de segundo orden, lo cual por cada segundo que pasa hasta los 250 segundos el incremento de la absorbancia es de 2E-05, ya en este periodo la absorbancia empieza a disminuir en 3E-08 probablemente debido a la finalización del sustrato de la enzima.

Tabla 9-3: Absorbancias de inhibición del veneno de *Bothrops atrox*.

| TIEMPO O SEG | MAXIMA ACTIVIDAD | 25 ppm | 50 ppm | 100 ppm | 150 ppm | 250 ppm | 1000 ppm |
|--------------|------------------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| 0 | 0,028 | 0,028 | 0,027 | 0,026 | 0,024 | 0,024 | 0,028 |
| 30 | 0,029 | 0,029 | 0,029 | 0,03 | 0,025 | 0,025 | 0,028 |
| 60 | 0,03 | 0,029 | 0,03 | 0,03 | 0,029 | 0,026 | 0,028 |
| 90 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,028 | 0,027 | 0,028 |
| 120 | 0,03 | 0,03 | 0,031 | 0,03 | 0,026 | 0,027 | 0,028 |
| 150 | 0,032 | 0,030 | 0,031 | 0,031 | 0,027 | 0,027 | 0,028 |
| 180 | 0,034 | 0,031 | 0,031 | 0,031 | 0,027 | 0,027 | 0,028 |
| 210 | 0,034 | 0,031 | 0,031 | 0,031 | 0,027 | 0,026 | 0,028 |
| 240 | 0,034 | 0,032 | 0,031 | 0,031 | 0,027 | 0,026 | 0,033 |
| 270 | 0,034 | 0,033 | 0,031 | 0,031 | 0,027 | 0,026 | 0,033 |
| 300 | 0,034 | 0,033 | 0,031 | 0,031 | 0,027 | 0,026 | 0,033 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

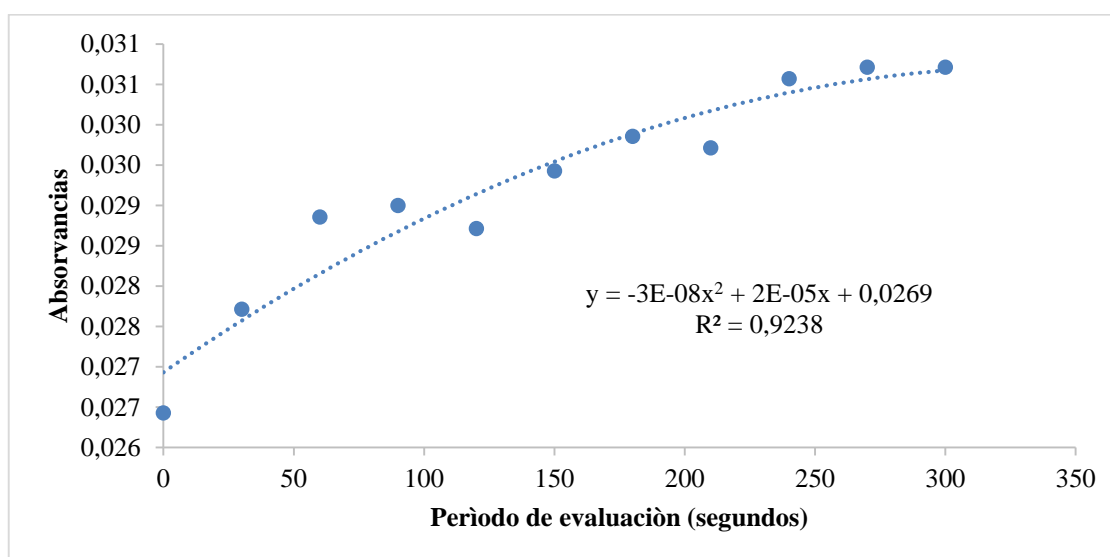


Gráfico 4-3: Regresión cuadrática de segundo orden del veneno de las absorbancias de la hialuronidasa de *Bothrops atrox*.

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

La absorbancia de la hialuronidasa del veneno de la serpiente equis está relacionado significativamente ($P < 0.1$) al tiempo de evaluación, el 92.38% está relacionado por el tiempo habiendo una regresión de segundo orden, lo cual por cada segundo que pasa hasta los 250 segundos, el incremento de la absorbancia es de $2E-05$ lo que indica que la absorbancia empieza a disminuir en $3E-08$ en ese periodo el sustrato de la enzima termina.

Se puede decir que el extracto hidroalcohólico a menor concentración libera menor cantidad de N-acetilglucosamina por lo tanto hay mayor inhibición.

3.7. Análisis Estadístico

Tabla 10-3: Test de Fisher

| F. Var. | Gl | S. Cuad. | C. Medio | Fisher | P. Fisher |
|---------------|-----|----------|----------|--------|-----------|
| Total | 153 | 0,0012 | | | |
| P. evaluac. | 10 | 0,0001 | 0,0000 | 9,97 | 2,9E-12 |
| Reptiles | 1 | 0,0002 | 0,0002 | 164,60 | 7,5E-25 |
| Concentración | 6 | 0,0006 | 0,0001 | 65,76 | 5,3E-37 |
| Inter. AB | 6 | 0,0000 | 0,0000 | 5,60 | 3,4E-05 |
| Error | 130 | 0,0002 | 0,0000 | | |
| CV % | | | 4,2367 | | |
| Media | | | 0,0280 | | |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

Se analizaron los datos mediante pruebas estadísticas para determinar si existe o no diferencia en las diferentes concentraciones del extracto.

El test de Fisher indicó que se rechaza la hipótesis nula, indicando de esta manera que el extracto de *Piper umbellatum* tiene actividad inhibitoria de la hialuronidasa debido a que P es menor a 0,05.

Tabla 11-3: Diferencias significativas entre las especies cobra y equis Test de Tukey.

| Veneno de | Media | Grupo |
|-----------|-------|-------|
| Cobra | 0,029 | a |
| Equis | 0,027 | b |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

El veneno de cobra registró una absorbancia de 0,029 siendo medianamente significativo al veneno de serpiente equis obteniendo con el valor de 0,027. Así se demuestra que la cantidad de inhibición de la hialuronidasa es mayor en el veneno de cobra.

Tabla 12-3: Diferencias significativas en las concentraciones Test Tukey.

| Concentración | Media | Grupo |
|---------------|--------|-------|
| control | 0,0314 | a |
| 25 ppm | 0,0290 | b |
| 50 ppm | 0,0285 | c |
| 100 ppm | 0,0283 | d |
| 150 ppm | 0,0263 | f |
| 250 ppm | 0,0249 | g |
| 1000 ppm | 0,0278 | e |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

La absorbancia 0,0314 de los venenos ofídicos difiere significativamente al usar diferentes concentraciones de la especie vegetal como: 25, 50, 100, 150, 250 y 1000 ppm reduciéndose a 0,0290, 0,0285, 0,0283, 0,0263, 0,0249, 0,0278 respectivamente.

Tabla 13-3: Diferencias significativas de concentración en función de los tiempos de análisis de los venenos de serpientes Test Tukey.

| Inter. AB | Media | grupo |
|-----------|-------|-------|
| A1B0 | 0,031 | b |
| A1B1 | 0,027 | e |
| A1B2 | 0,027 | e |
| A1B3 | 0,027 | e |
| A1B4 | 0,026 | f |
| A1B5 | 0,024 | g |
| A1B6 | 0,026 | f |
| A2B0 | 0,032 | a |
| A2B1 | 0,031 | b |
| A2B2 | 0,030 | c |
| A2B3 | 0,030 | c |
| A2B4 | 0,027 | e |
| A2B5 | 0,026 | f |
| A2B6 | 0,029 | d |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

Al analizar las absorbancias del veneno de cobra y serpiente equis del oriente sin el extracto se obtuvo una absorbancia de 0,032 y 0,031 el valor se diferencia de las demás concentraciones, la absorbancia se va reduciendo al usar ambos venenos, este resultado se da por la variabilidad de géneros, especies y cantidad de enzima que compone cada veneno.

Tabla 14-3: Contrastes entre concentraciones para el veneno de serpiente Equis Test de Bonferroni

| | MUESTRAS | Xi-Xj | tij | t55,0.002 | p(t55>tij) |
|----|------------------|-------------|-------------|-------------|------------------|
| 1 | control -25ppm | 0,003636364 | 0,012946757 | 6,99358E-05 | NO SIGNIFICATIVO |
| 2 | control -50ppm | 0,004181818 | 0,01488877 | 3,86906E-05 | NO SIGNIFICATIVO |
| 3 | control -100ppm | 0,004454545 | 0,015859777 | 0,000132947 | SIGNIFICATIVO |
| 4 | control -150ppm | 0,005090909 | 0,018125459 | 6,65918E-05 | NO SIGNIFICATIVO |
| 5 | control -250ppm | 0,007363636 | 0,026217182 | 3,5658E-05 | NO SIGNIFICATIVO |
| 6 | control -1000ppm | 0,004727273 | 0,016830784 | 0,000131329 | SIGNIFICATIVO |
| 7 | 25ppm-50ppm | 0,000545455 | 0,001942014 | 0,051942421 | SIGNIFICATIVO |
| 8 | 25ppm-100ppm | 0,000818182 | 0,00291302 | 0,019980838 | SIGNIFICATIVO |
| 9 | 25ppm-150ppm | 0,005090909 | 0,018125459 | 0,000154827 | SIGNIFICATIVO |
| 10 | 25ppm-250ppm | 0,007363636 | 0,026217182 | 4,24065E-05 | NO SIGNIFICATIVO |
| 11 | 25ppm-1000ppm | 0,004727273 | 0,016830784 | 0,00143713 | SIGNIFICATIVO |

| | | | | | |
|----|----------------|--------------|-------------|-------------|------------------|
| 12 | 50ppm-100ppm | 0,000272727 | 0,000971007 | 0,340893132 | SIGNIFICATIVO |
| 13 | 50ppm-150ppm | 0,000909091 | 0,003236689 | 0,016197071 | SIGNIFICATIVO |
| 14 | 50ppm-250ppm | 0,003181818 | 0,011328412 | 0,000230819 | SIGNIFICATIVO |
| 15 | 50ppm-1000ppm | 0,000545455 | 0,001942014 | 0,192127031 | SIGNIFICATIVO |
| 16 | 100ppm-150ppm | 0,000636364 | 0,002265682 | 0,045541284 | SIGNIFICATIVO |
| 17 | 100ppm-250ppm | 0,002909091 | 0,010357405 | 0,000154827 | SIGNIFICATIVO |
| 18 | 100ppm-1000ppm | 0,000272727 | 0,000971007 | 0,465049641 | SIGNIFICATIVO |
| 19 | 150ppm-250ppm | 0,002272727 | 0,008091723 | 2,13478E-05 | NO SIGNIFICATIVO |
| 20 | 150ppm-1000ppm | -0,000363636 | 0,001294676 | 0,037928971 | SIGNIFICATIVO |
| 21 | 250ppm-1000ppm | -0,002636364 | 0,009386399 | 2,75853E-05 | NO SIGNIFICATIVO |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

En la tabla se puede observar los 21 contrastes mediante el test t de student y analizando los resultados de los contrastes se pudo identificar subconjuntos homogéneos resumidos de la siguiente forma:

Tabla 15-3: Diferencias significativas de concentraciones del extracto Test de Bonferroni.

| MUESTRAS | P(T<=t) dos colas |
|-----------------|-------------------|
| control -25ppm | 6,99358E-05 |
| 150ppm-250ppm | 2,13478E-05 |
| 250ppm-1000ppm | 2,75853E-05 |
| control -250ppm | 3,5658E-05 |
| control -50ppm | 3,86906E-05 |
| 25ppm-250ppm | 4,24065E-05 |
| control -150ppm | 6,65918E-05 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

El análisis estadístico de los resultados, permite concluir que la capacidad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Piper umbellatum* hay actividad a concentraciones de 25,50, 100 y 150 ppm, siendo esta última la de mejor capacidad inhibitoria 250 ppm ya que es significativamente menor a la de control y aplicando una mayor concentración la actividad se reduce.

El test de Bonferroni permite detectar cual es el nivel de inhibición de la enzima más efectivo en el veneno de la serpiente equis.

Tabla 16-3: Contrastes entre concentraciones para el veneno de la cobra Test de Bonferroni.

| | MUESTRAS | $X_i - X_j$ | BSD | $P(T \leq t)$ dos colas | $p(t_{55} > t_{ij})$ |
|----|------------------|-------------|-------------|-------------------------|----------------------|
| 1 | control -25ppm | 0,0012 | 0,004207696 | 0,007284085 | SIGNIFICATIVO |
| 2 | control -50ppm | 0,0015 | 0,005502372 | 0,005179023 | SIGNIFICATIVO |
| 3 | control -100ppm | 0,0016 | 0,005826041 | 0,003564774 | SIGNIFICATIVO |
| 4 | control -150ppm | 0,0050 | 0,01780179 | 0,000019059 | NO SIGNIFICATIVO |
| 5 | control -250ppm | 0,0056 | 0,020067473 | 0,000005814 | NO SIGNIFICATIVO |
| 6 | control -1000ppm | 0,0024 | 0,008415392 | 0,003482470 | SIGNIFICATIVO |
| 7 | 25ppm-50ppm | 0,0004 | 0,001294676 | 0,267427851 | SIGNIFICATIVO |
| 8 | 25ppm-100ppm | 0,000 | 0,001618345 | 0,211059219 | SIGNIFICATIVO |
| 9 | 25ppm-150ppm | 0,004 | 0,013594095 | 0,000024367 | NO SIGNIFICATIVO |
| 10 | 25ppm-250ppm | 0,004 | 0,015859777 | 0,000002807 | NO SIGNIFICATIVO |
| 11 | 25ppm-1000ppm | 0,001 | 0,004207696 | 0,014497456 | SIGNIFICATIVO |
| 12 | 50ppm-100ppm | 0,000 | 0,000323669 | 0,340893132 | SIGNIFICATIVO |
| 13 | 50ppm-150ppm | 0,003 | 0,012299419 | 0,000000626 | NO SIGNIFICATIVO |
| 14 | 50ppm-250ppm | 0,004 | 0,014565101 | 0,000000015 | NO SIGNIFICATIVO |
| 15 | 50ppm-1000ppm | 0,001 | 0,00291302 | 0,232752650 | SIGNIFICATIVO |
| 16 | 100ppm-150ppm | 0,003 | 0,01197575 | 0,000001649 | NO SIGNIFICATIVO |
| 17 | 100ppm-250ppm | 0,004 | 0,014241432 | 0,000000113 | NO SIGNIFICATIVO |
| 18 | 100ppm-1000ppm | 0,001 | 0,002589351 | 0,306876090 | SIGNIFICATIVO |
| 19 | 150ppm-250ppm | 0,001 | 0,002265682 | 0,066915168 | SIGNIFICATIVO |
| 20 | 150ppm-1000ppm | -0,003 | 0,009386399 | 0,006313746 | SIGNIFICATIVO |
| 21 | 250ppm-1000ppm | -0,003 | 0,011652081 | 0,001773687 | SIGNIFICATIVO |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

Se realizaron 21 contrastes mediante el test de t de student y analizando los resultados de los contrastes se pudo identificar subconjuntos homogéneos resumidos de la siguiente forma.

Tabla 17-3: Diferencias significativas de concentraciones del extracto Test de Bonferroni

| MUESTRAS | P(T<=t) dos colas |
|-----------------|-------------------|
| control -150ppm | 0,000019059 |
| control -250ppm | 0,000005814 |
| 25ppm-150ppm | 0,000024367 |
| 25ppm-250ppm | 0,000002807 |
| 50ppm-150ppm | 0,000000626 |
| 50ppm-250ppm | 0,000000015 |
| 100ppm-150ppm | 0,000001649 |
| 100ppm-250ppm | 0,000000113 |

Realizado por: Morales, Aracely, 2019

La capacidad inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Piper umbellatum* a los 25, 50,100 y 150 ppm no es significativamente distinta a los obtenidos en la máxima actividad o control, por lo que estas quedarían descartadas sin embargo a 250ppm la capacidad inhibitoria es significativamente menor a la de control y siendo esta la de mejor capacidad para inhibir la enzima a partir de los 210segundos. Al contrario de la de 1000 ppm que al tener mayor concentración de extracto su capacidad inhibitoria se reduce.

CONCLUSIONES

- Todos los ensayos de control de calidad de la planta se basaron en la normativa USP #35, obteniéndose que la especie vegetal cumplía con todos los parámetros establecidos de calidad.
- El tamizaje Fitoquímico identificó de forma cualitativa los metabolitos secundarios como: grasas, alcaloides, lactonas, cumarinas, azúcares, triterpenos, esteroides, saponinas, quinonas, flavonoides, compuestos fenólicos, compuestos amargos. Dichos metabolitos son responsables de una variedad de efectos biológicos como: antioxidante, antiinflamatorio, antifúngico, antibacteriano, anticancerígeno, insecticida etc.
- Se determinó la cantidad de fenoles: $14,51 \pm 0,11$ mg Equivalentes de Ácido Gálico/g de extracto seco y flavonoides $14,49 \pm 0,09$ mg Equivalentes de Quercetina /g de extracto seco de las hojas de *Piper umbellatum* L.
- El extracto hidroalcohólico de *Piper umbellatum* L. a 150 ppm logró una inhibición del 81% sobre la hialuronidasa bovina, disminuyendo el porcentaje de inhibición desde los 250 ppm.
- Se determinó que la inhibición máxima en ambos venenos fue a 250 ppm, con una inhibición del 23,754% en el veneno de cobra difiriendo significativamente con el veneno de la serpiente equis que reportó un porcentaje máximo de inhibición de 17,765%. Estos resultados varían por la genética de cada especie, la cantidad de hialuronidasa presente en el veneno y por la edad del ofidio.

RECOMENDACIONES

- Al momento de trabajar con enzimas es necesario tener un espacio adecuado, limpio, materiales de calidad y tener un control de temperatura y humedad del sitio.
- Es necesario tener a disposición todos los reactivos e instrumentos necesarios, y prepararlos en el instante que se va a realizar el estudio.
- Se recomienda continuar con el estudio de esta planta y otras especies empleadas para las mordeduras de serpientes por la gente nativa de la zona amazónica y costera del Ecuador.
- Se recomienda estudiar el efecto de esta especie sobre otras enzimas que forman parte del veneno de los ofidios.

BIBLIOGRAFÍA

AFRICAN FLOWERING PLANTS DATABASE (AFPD). African Flowering Plants Database. *Base de Donnees des Plantes a Fleurs D'Afrique*. [en línea], 2008. [consulta: 25 julio 2019]. Disponible en: <https://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/afrika/details.php?langue=fr&id=114950>.

AYRES, S. *Tratado de medicina crítica y terapia intensiva*. 2000, IV. Montevideo: Panameicana.

CAMARGO, A.M.T. F., et al. "Plantas como antiveneno: del mito al logos". *Universita Uruguay: Comisión Sectorial de Investigación Científica*. [en línea]. 2014, Uruguay, [consulta: 23 junio 2019]. ISBN 9789974012790. Disponible en: www.universidad.edu.uy/bibliotecas/dpto_publicaciones.htm.

CAMILO, J. et al. *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758). *Catálogo de anfibios y reptiles de Colombia* [en línea], 2018, vol. 4, no. November, pp. 7-23. [consulta: 23 junio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/329124809_Bothrops_atrox_Linnaeus_1758.

CELIS, Á. & MENDOZA, C. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana* [en línea], 2008, vol. 26, no. 1, pp. 97-106. [consulta: 26 junio 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/281444366_Extractos_vegetales_utilizados_como_biocontroladores_con_énfasis_en_la_familia_Piperaceae_Una_revision.

DA SILVA, I.F., et al. "Evaluation of acute toxicity, antibacterial activity, and mode of action of the hydroethanolic extract of *Piper umbellatum* L". *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2014, vol. 151, no. 1, pp. 137-143. [consulta: 23 agosto 2019]. ISSN 03788741. DOI 10.1016/j.jep.2013.10.011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.011>.

JIMÉNEZ PORRAS, J. M. Cómo funciona el veneno de serpiente y tipos de veneno. [en línea], 2015. [consulta: 29 junio 2019]. Disponible en: <https://deserpientes.net/como-funciona-el-veneno-de-serpiente-y-tipos-de-veneno/>.

EL COMERCIO. Un estudio analizó 80 plantas de la Amazonía ecuatoriana. [en línea], 2016. [consulta: 26 junio 2019]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/estudio-analisis-plantas-amazonia-ecuador.html>.

EL COMERCIO. El país producirá suero antiofídico. [en línea], 2018. S.l.: [consulta: 26 junio 2019]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/tendencias/pais-suero-antiofídico-veneno-serpiente.html>.

ESPINOZA, P.C. et al. "Aplicación clínica del ácido hialurónico". [en línea], 2015. [consulta: 25 julio 2019]. Disponible en: <http://www.bvs.hn/RFCM/pdf/2015/pdf/RFCMVol12-2-2015-6.pdf>.

GUILLERMO, E. & MASSUO, J. "Cultivo de tejidos de Piper sp . (Piperaceae): Propagación , organogénesis y conservación de germoplasma in vitro Tissue culture of Piper sp . (Piperaceae): In vitro propagation , organogenesis and germplasm conservation. *Redalyc* [en línea], 2012, vol. XIV, pp. 49-60. [consulta: 23 mayo 2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77625401006.pdf>.

ITURRALDE, P. "Enferma enferma y muere problemas del desarrollo farmacéutico público en el Ecuador". [en línea], 2016, pp. 47. [consulta: 27 agosto 2019]. Disponible en: <http://cdes.org.ec/web/wp-content/uploads/2016/11/EnfermaEnfermaMuere.pdf>.

JARAMILLO, A. "Phylogeny and Patterns of Floral Diversity in the Genus Piper (Piperaceae)". *American Journal of Botany* [en línea], 2015, vol. 88, no. February, pp. 706-716. [consulta: 23 mayo 2019]. DOI 10.2307/2657072. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/12031236_Phylogeny_and_Patterns_of_Floral_Diversity_in_the_Genus_Piper_Piperaceae

JIMÉNEZ PORRAS, J. Bioquímica, Farmacología y Fisiopatología De Los Venenos De Serpientes. 1994, pp. 43-55.

KATO, M.J. & FURLAN, M. "Chemistry and evolution of the Piperaceae". *Pure and Applied Chemistry* [en línea], 2007, vol. 79, no. 4, pp. 529-538. [consulta: 25 agosto 2019]. DOI 10.1351/pac200779040529. Disponible en: <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/pac.2007.79.issue-4/pac200779040529/pac200779040529.pdf>.

KUNTH, D.P. et al. "Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de *Piper auritum* Kunth" . *Avances en Investigación Agropecuari* [en línea], 2018, vol. 22, no. 1, pp. 77-89. [consulta: 25 agosto 2019]. Disponible en: <http://ww.uco.mx/revaia/portal/pdf/2018/enero/6.pdf>.

LIYANAARACHCHI, G. et al. "Tyrosinase , elastase , hyaluronidase , inhibitory and antioxidant activity of Sri Lankan medicinal plants for novel cosmeceuticals". *Industrial Crops & Products* [en línea], 2018, vol. 111, pp. 597-605. [consulta: 25 julio 2019]. ISSN 0926-6690. DOI 10.1016/j.indcrop.2017.11.019. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.019>.

MALIQUE & GUTIERREZ, J. "Snakebite envenomation in Central and South America . In : Critical Care Snakebite Envenomation in Central and South America". [en línea], 2016, S.I.: Springer International, pp. 1-22. [consulta: 25 junio 2019]. ISBN 9783319207902. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/285045712_Snakebites_in_Central_and_South_America_epidemiology_clinical_features_and_clinical_management.

MANOJ, R. "Estimation of Total Phenolic and Total Flavonoid Content and Assessment of in vitro Antioxidant Activity of Extracts of *Hamelia patens* Jacq. Stems". *Journal of Phytochemistry* [en línea], 2016, vol. 10, no. 2, pp. 67-74. [consulta: 26 julio 2019]. DOI 10.3923/rjphyto.2016.67.74. Disponible en: <http://docsdrive.com/pdfs/academicjournals/rjphyto/2016/67-74.pdf>.

MARTÍNEZ, C.E.C. "Plantas medicinales de los Andes Ecuatorianos". [en línea], 2006, [consulta: 19 julio 2019]. Disponible en: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISABookpdf/>

MATIOLI, F.M. et al. "Molecular cloning and structural modelling of gamma-phospholipase A2 inhibitors from *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus* snakes". *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea], 2017, vol. 103, no. Mayo, pp. 525-532. [consulta: 15 julio 2019]. ISSN 0141-8130. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.076. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.076>.

MENESES, C. "Las intoxicaciones en el ecuador". [en línea], 2011, pp. 58-68. [consulta: 15 junio 2019]. Disponible en: <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi61OjJv8fnAhVCnFkKHUdkBP4QFjAAegQIBhAB&url=https%3A%2F%2Frevistas.ute.edu.ec%2Findex.php%2Ffeidos%2Farticle%2Fdownload%2F82%2F76%2F&usg=AOvVaw0VZFreytGIFha3aFxu3Wwg>.

MIRANDA, M. *Farmacognosia y química de los productos naturales: Normas Ramales de Drogas Crudas y extractos y Tinturas*. 6ta. La Habana- Cuba: 2006.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA (MSP). Manual de normas y procedimientos. [en línea], 2008, Ecuador, pp. 1-60. [consulta: 15 julio 2019]. Disponible en: [https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL DE NORMAS PROCEDIM. PREVENC.MORDEDURA DE SERPIENTES\(1\).pdf](https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/MANUAL DE NORMAS PROCEDIM. PREVENC.MORDEDURA DE SERPIENTES(1).pdf).

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA (MSP). Manejo clínico del envenenamiento por mordeduras de serpientes venenosas y picaduras de escorpiones [en línea], 2017, Ecuador. [consulta: 15 julio 2019]. Disponible en: https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/AC_00153_2017_21_NOV.pdf.

MINISTERIO DE TRABAJO Y RECURSOS HUMANOS (MTRH). *Codificación del Código del Trabajo* [en línea], 1997, Ecuador: s.n. [consulta: 15 mayo 2019]. Disponible en: <http://www.ilo.org/dyn/natlex/docs/WEBTEXT/47812/68395/S97ECU01.htm>.

NIÑO, S.M. & DORR, L.J. De los andes de Venezuela. *Harvard Papers in Botany* [en línea], 2018, vol. 23, no. 1, pp. 9-13. [consulta: 28 abril 2019]. DOI 10.3100/hpib.v23iss1.2018, n2.

Disponible en: https://huh.harvard.edu/files/herbaria/files/23_1_9_ninao_dorr.pdf.

OLIVEIRA, M.E. "When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central amazonia, brazil". [en línea], 2001, vol. 8, no. 2, pp. 101-110. [consulta: 28 julio 2019]. Disponible en: <http://eco.ib.usp.br/labvert/atrox-activity.pdf>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Mordeduras de serpientes venenosas. [en línea], 2019. [consulta: 28 septiembre 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>.

OSORIO-DELGADO, M.A., et al. "Biomedical applications of polymeric biomaterials - Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos". *Scielo* [en línea], 2017, vol. 84, no. 201, pp. 241-252. [consulta: 28 julio 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v84n201/0012-7353-dyna-84-201-00241.pdf>.

PAREDES, D.J., BUENAÑO, M. & RODRIGUEZ, N. " Use Of Medicinal Plants In The San Jacinto Community - Ventanas Municipality , Los Ríos – Ecuador". *U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* [en línea], 2015, vol. 18. [consulta: 28 abril 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-42262015000100006

PAZMIÑO GUSTAVO. Reptiles del Ecuador. *BIO WEB* [en línea], 2018. [consulta: 26 junio 2019]. Disponible en: <https://bioweb.bio/faunaweb/reptiliaweb/FichaEspecie/Bothropsatrox>.

PÉREZ, ROJO & VICENTE, R. "Estudio del veneno de serpientes: tipos y tratamientos" "Snakes venoms: kinds and treatments". *Universidad Complutense de Madrid*, [en línea], 2008, vol. 2, no. 2, pp. 100-104. [consulta: 20 julio 2019]. ISSN: 1988-2688

PILCO, G., et al."Actividad inhibitoria del extracto de geranio (*Pelargonium x domesticum*) sobre hialuronidasa". *Libro de Memorias V Congreso Internacional de la Ciencia, Tecnología, Emprendimiento e Innovación* [en línea], 2018, pp. 821-830. [consulta: 26 julio 2019]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/profile/Cristian_Patino/publication/330673953_FORMULACION_Y_EVALUACION_DE_PROYECTOS_PARA_EL_MANEJO_SOSTENIBLE_DE_RECURSOS_NATURALES_POR_MARCO_LOGICO_ANALISIS_DE_LA_METODOLOGIAAAt_Riobamba-Ecuador/links/5c4e94cf92851c22a395daf1/FORMULACION-Y-EVALUACION-DE-PROYECTOS-PARA-EL-MANEJO-SOSTENIBLE-DE-RECURSOS-NATURALES-POR-MARCO-LOGICO-ANALISIS-DE-LA-METODOLOGIAAAt-Riobamba-Ecuador.pdf#page=821.

PINO, N. & MELENDEZ, E. "Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* [en línea], 2015, vol. 8, no. 4, pp. 301-304. [consulta: 19 julio 2019]. Disponible en: <http://www.researchgate.net/publication/26872789>.

POHLE, P. & REINHARDT, S. "Indigenous knowledge of plants and their utilization among the Shuar of the lower tropical mountain forest in southern". *Journal of Ecology and application*, [en línea], 2004, vol. 7, no. December. [consulta: 19 julio 2019]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/2946>

PLANT RESOURCES OF TROPICAL AFRICA (PROTA4U). *Piper umbellatum L.* Registro PROTA4U. [en línea], 2016. [consulta: 29 abril 2019]. Disponible en: <https://www.prota4u.org/database/protav8.asp?g=pe&p=Piper+umbellatum+L>.

ROERSCH, C.M. "Piper umbellatum L. : A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation". *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2010, vol. 131, no. 3, pp. 522-537. [consulta: 13 julio 2019]. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/j.jep.2010.07.045. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.045>.

ROODT, A.R. et al. "Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México". [en línea], 2005, vol. 141, no. 1, pp. 13-21. [consulta: 26 agosto 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/gmm/v141n1/v141n1a3.pdf>.

ROVER, M.R. & BROWN, R.C. method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*

[en línea], 2013, vol. 104, pp. 366-371. [consulta: 16 junio 2019]. ISSN 0165-2370. DOI 10.1016/j.jaap.2013.06.011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaap.2013.06.011>.

SILVA, J.J. "Las serpientes del género *Bothrops* en la amazonia colombiana". *Acta Médica Colombiana* [en línea], 1989, vol. 14, pp. 148-165. [consulta: 25 julio 2019]. Disponible en: <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/03-1989-04.pdf>.

SMALLIGAN, R., et al. "Papers Crotaline snake bite in the Ecuadorian Amazon : randomised double blind comparative trial of three South American polyspecific". *PubMed* [en línea], 2004, vol. 329, pp. 1-7. [consulta: 25 julio 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539665>.

SOLER & RODRIGUEZ. "DOMÉSTICOS TOXIC AND CLINICAL ASPECTS OF POISONOUS SNAKES BITE IN DOMESTIC ANIMALS". *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* [en línea], 2006, vol. 53, pp. 105-115. [consulta: 16 julio 2019]. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/17815/18724>.

SÜNTAR, I., et al. "Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models". *Journal of Ethnopharmacology* [en línea], 2012, vol. 139, pp. 533-540. [consulta: 11 julio 2019]. DOI 10.1016/j.jep.2011.11.045. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155393>.

TORRE, L. De & MACÍA, M.J. "La etnobotánica en el Ecuador". [en línea], 2008, pp. 13-27. [consulta: 19 mayo 2019]. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/PIPER/La-etnobotanica-en-el-Ecuador.pdf>.

TORRES, A. "Comprobación de la actividad inhibitoria del extracto hidro-alcohólico de *piper peltatum* sobre *hialuronidasa*". [en línea], 2018, (Pregrado), ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, Riobamba, Ecuador, pp. 34-42. [consulta: 25 agosto 2019]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9572/1/56T00833.pdf>

TORRES MORERA, L.M. *Tratado de cuidados críticos y emergencias*. vol. II. España: 2002. Arán Ediciones.

TROPICOS. Tropicos.org. *Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador* [en línea], 2009. [consulta: 11 febrero 2019]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/25001142?projectid=2>.

ULLOA, C. & MOLLER, P. Árboles y arbustos de los Andes Ecuador. [en línea], 2016. [consulta: 15 junio 2019]. Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=125531.

VACAS, O. "Plantas medicinales de Ecuador: usos tradicionales, estrategias, marco legal y algunos datos estadísticos nacionales e internacionales". *Nuestra Ciencia* [en línea]. Ecuador, 2017, vol. 19, pp. 60. [consulta: 22 agosto 2019]. Disponible en: <https://www.puce.edu.ec/portal/wp-content/uploads/2019/07/Nuestra-Ciencia-n.º-19.pdf>.

VALLEDOR DE LOZAYA, A. *Envenenamientos por animales: animales venenosos y urticantes del mundo* [en línea], 1994, vol. 1, Madrid s.n. [consulta: 20 julio 2019]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=gISwxQhBw0cC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

VALOIS, H. & PINOS, N. "Ethnobotany of Four Black Communities of the Municipality". *Ecology and Application* [en línea], 2004, vol. 7, no.1, [consulta: 02 julio 2019]. Disponible en: <http://www.lyonia.org/downloadPDF.php?pdfID=2.312.1>.

ZAMBRANO, L. & BUENAÑO, M. "Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos , Quevedo , Ecuador". *Universidad y Salud* [en línea]. Quevedo, Ecuador, 2015, pp. 97-111. [consulta: 20 julio 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/reus/v17n1/v17n1a09.pdf>.

ANEXOS

ANEXO A. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL.



ANEXO B. CONTROL DE CALIDAD DE LA ESPECIE VEGETAL.



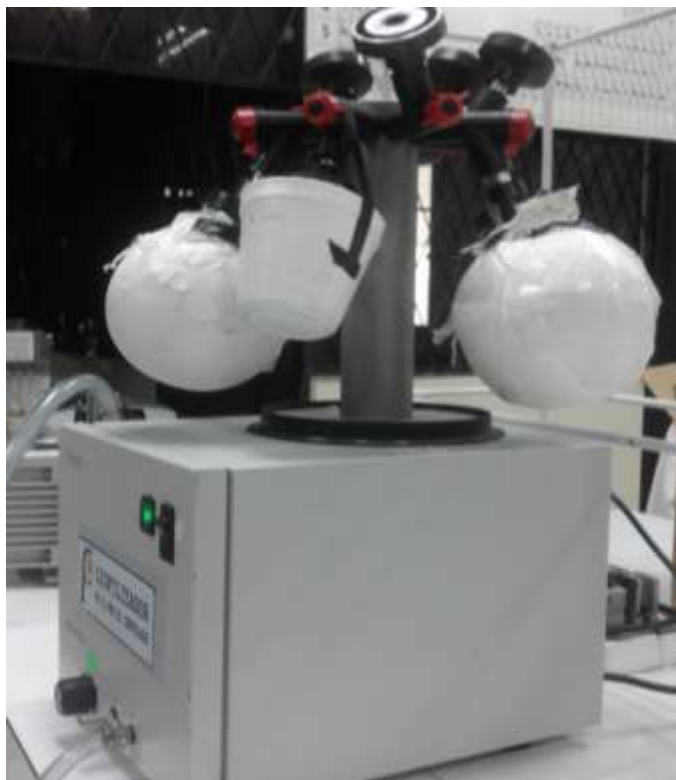
ANEXO C. CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO.



ANEXO D. TAMIZAJE FITOQUÍMICO.



ANEXO E. EXTRACTO LIOFILIZADO.



ANEXO F. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y FENOLES TOTALES.



ANEXO G. INHIBICIÓN DE LA HIALURONIDASA BOVINA.



ANEXO H. VENENO LIOFILIZADO DE *Bothrops atrox*.



ANEXO I: GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE *Piperumbellatum* L.

MINISTERIO DEL AMBIENTE



EL GOBIERNO DE PASTAZA

GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y FAUNA SILVESTRE Nro. DPAP-UPN-VC-2019-021

Fecha de emisión: 22/marzo/2019

Fecha de movilización: 26/marzo/2019 - 08h00

Válido hasta: 27/marzo/2019 - 08h00

La Dirección Provincial de Pastaza, Autoriza a. BQF. Gisela Pilco, MaC. Docente Investigadora de la ESPOCH. C.C. 0603914318 el cual solicita una guía de movilización de dos muestras de especies vegetales. Desde: La Parroquia Puyo-Canto Pastaza -Provincia de Pastaza, hacia: la Ciudad de Riobamba- Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. de acuerdo a la siguiente lista:

1.- Cuadro de Información N°1.

| No | Características | Cantidad |
|----|--|----------|
| 1 | Muestras de especies vegetales. (<i>Piper umbellatum</i>) | 2 |

Observaciones:

Los especímenes o elementos constitutivos se movilizarán en:
Vía Transporte público interprovincial de la cooperativa Sangay.

Marca: Tipo: Color: Placa:

Conductor: C.I. No.

Los especímenes van en calidad de:

- Traslado de centro de manejo ()
- Comercio: ()
- Investigación: (X)

Desde: La Parroquia Puyo. Canto Pastaza -Provincia de Pastaza

Hasta: Ciudad de Riobamba- Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

- Nombre de la Investigación: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA CONSERVACION Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" – MAE-DNB-CM-2018-0086

Firmas de responsabilidad:


Ldo. Victor Curicama
Responsable de Biodiversidad DPAP.
C.I. 171909902-8


M.Sc. Gisela Pilco
Docente Investigador
C.I. 060391431-8



Oficio Nro. MAE-DPAP-2019-0520-O

Puyo, 25 de marzo de 2019

Copia:

Señorita Ingeniera
Alexandra Maribel Humanante Herrera
Especialista en Patrimonio Natural Provincial 3

Señor Licenciado
Victor Alfonso Curicama Quishpe
Especialista de Vida Silvestre Provincial

Señora Licenciada
Blanca Del Rocio Izurieta Romero
Secretaría Provincial

vc/ah



SEÑOR RESPONSABLE DEL
JIMMY IVAN
GUERRERO
NARANJO

Dirección Provincial de Pastaza • Código Postal: 160150 / Puyo - Ecuador • Teléfono: (593 3) 2884053 / 2884270
Dirección: González Suárez y Av. Ceslao Marín



Oficio Nro. MAE-DPAP-2019-0520-O

Puyo, 25 de marzo de 2019

Asunto: AUTORIZACIÓN DE GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE DOS MUESTRAS DE LA ESPECIE VEGETAL PIPER UMBELLATUM A LA CIUDAD DE RIOBAMBA

Señorita Bioquímica Farmacéutica
Gisela Alexandra Pilco Bonilla
Técnica de Laboratorio de Aguas - Penípe.
En su Despacho

De mi consideración:

Reciba un cordial y atento saludo de quienes conformamos la Dirección Provincial del Ambiente de Pastaza.

En referencia al oficio: No. MAE-DPAP-2019-0780-E. Suscrito por el M.Sc. Gisela Pilco, Docente Investigador. De la ESPOCH, en el cual solicita autorización de una guía de Movilización de muestras de flora silvestre dentro del proyecto. "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" hasta la ciudad de Riobamba (Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

Sírvase encontrar adjunto el documento habilitante para dicha movilización.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Documento firmado electrónicamente

Ing. Jimmy Ivan Guerrero Naranjo
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA

Referencias:

- MAE-DPAP-2019-0780-E

Anexos:

- MAE-DPAP-2019-0780-E

- permiso_de_movilizacion_021_piper_umbellatum.pdf

ANEXO J: CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE *Piperumbellatum* L.



HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.027.CHEP.2019

12 de marzo del 2019

Msc. Karen Acosta

**RESPONSABLE TÉCNICA
CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS**

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que dentro del **Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos** asignado con el : Nro-MAE-DNB-CM-2018-0086. que al señorita Aracely Elizabeth Morales Meneses con CI: 180478665-3, Tesista de Bioquímica y Farmacia, se identificó: *Piper umbellatum* L. La especie se revizó en los registros del herbario y en un tiempo determinado ingresará a la colección del herbario. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y la interesada puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.



Ing. Jorge Caranqui Msc.
BOTANICO
HERBARIO ESPOCH



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO**



**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA**

Fecha de entrega: / 03 / 2020

| |
|---|
| INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S) |
| Nombres – Apellidos: Aracely Elizabeth Morales Meneses |
| INFORMACIÓN INSTITUCIONAL |
| Facultad: Ciencias |
| Carrera: Bioquímica y Farmacia |
| Título a optar: Bioquímica Farmacéutica |
| f. Analista de Biblioteca responsable: |