



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
CITOTÓXICA *in vitro* DE HOJAS DE *Piper peltatum L.*”**

AUTORA: JAHAIRA CAROLINA BERMÚDEZ RIOFRÍO

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previo a la obtención del Título de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Jahaira Carolina Bermúdez Riofrío

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

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

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DE HOJAS DE *Piper peltatum L.***” de responsabilidad de la señorita Jahaira Carolina Bermúdez Riofrío, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza, M.Sc.

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. John Quispillo, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Jahaira Carolina Bermúdez Riofrío, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 10 de Noviembre del 2017

Jahaira Carolina Bermúdez Riofrío
230039851-4

DEDICATORIA

A Dios, mi padre celestial, quien ha sido mi guía en cada paso de mi vida, quien me ha dado la fortaleza necesaria para afrontar cada dificultad en mi camino.

A mis Padres Ramón y Cristina, a quienes admiro tanto por cada uno de sus logros, quienes siempre me apoyaron incondicionalmente en cada etapa de mi vida, y que a través de sus consejos y dedicación se han convertido en un pilar fundamental en mi existencia.

A mi Hermano Emiliano y a todos mis familiares y amigos, quienes siempre creyeron en mí y me alentaron a cumplir este nuevo logro.

Jahaira Bermúdez

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme en esta nueva etapa.

A mis Padres, familiares y amigos por brindarme su constante apoyo en la culminación de este gran proyecto.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, especialmente la Escuela de Bioquímica y Farmacia, y sus docentes por la formación académica y ética brindada para la obtención de mi título académico.

A mi tutor BQF. Diego Vinueza por su asesoramiento en la dirección de este proyecto.

Al BQF. John Quispillo, Miembro del Tribunal de Tesis por su tiempo brindado.

A Marco Janeta por su valioso aporte en el montaje de la metodología desarrollada en esta investigación.

Jahaira Bermúdez

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xvii
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	2
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General	4
Objetivo Específico.....	4
CAPÍTULO I.....	5
1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1 El Género Piper	5
1.2 Piper peltatum L.....	6
1.1.1 Descripción Botánica	6
1.2.1 Sinónimos.....	7
1.2.2 Nombres vernáculos	7
1.2.3 Clasificación Taxonómica.....	7
1.2.4 Hábitat.....	7
1.2.5 Usos Etnomédicos y Modo de empleo	8
1.2.6 Composición Química.....	8
1.2.7 Actividad Farmacológica y Biológica.....	9
1.3 Inflamación.....	10
1.3.1 Definición.....	10
1.3.2 Clasificación de los Tipos de Inflamación	11
1.1.1.1 Por la duración:	11
1.3.2.1 Por la etiología:	11
1.3.2.2 Por la localización:	12
1.3.3 Fases de la inflamación	12

1.3.4	Proceso de la Inflamación	12
1.3.4.1	Inflamación aguda local	12
1.3.5	Manifestaciones de la Reacción Inflamatoria.....	15
<i>1.4</i>	<i>Antiinflamatorios.....</i>	<i>16</i>
1.4.1	Medicamentos Antiinflamatorios Esteroides o Glucocorticoides	16
1.4.2	Analgésicos, Antipiréticos, Antiinflamatorios no Esteroides (AINEs)	16
1.4.2.1	Clasificación de los AAP/AINEs	17
1.4.2.2	Efectos Adversos:.....	17
<i>1.5</i>	<i>Compuestos Antiinflamatorios de origen natural</i>	<i>18</i>
1.5.1	Compuestos Fenólicos.....	18
1.5.2	Flavonoides	18
<i>1.6</i>	<i>Modelos de evaluación in vitro de la Actividad Antiinflamatoria.....</i>	<i>19</i>
1.6.1	Ensayos in vitro colorimétricos con sales de tetrazolio.....	19
<i>1.7</i>	<i>Viabilidad Celular para evaluar la Actividad Citotóxica in vitro</i>	<i>20</i>
1.7.1	Estudios in vitro colorimétricos con sales de tetrazolio	20
CAPÍTULO II.....		21
2	MARCO METODOLÓGICO.....	21
<i>2.1</i>	<i>Lugar de la Investigación.....</i>	<i>21</i>
<i>2.2</i>	<i>Identificación del material vegetal.....</i>	<i>21</i>
<i>2.3</i>	<i>Recolección del material vegetal</i>	<i>21</i>
<i>2.4</i>	<i>Materiales, equipos y reactivos.....</i>	<i>21</i>
2.4.1	Material Vegetal.....	21
2.4.2	Material Biológico.....	22
2.4.3	Material farmacológico	22
2.4.4	Materiales de laboratorio utilizados	22
2.4.5	Equipos.....	24
2.4.6	Reactivos	25
<i>2.5</i>	<i>Técnicas y Métodos</i>	<i>26</i>
2.5.1	Preparación de la Droga cruda	26

2.5.2	Parámetros de control de calidad de droga cruda.....	26
2.5.2.1	Determinación del contenido de humedad	27
2.5.2.2	Determinación de cenizas totales	27
2.5.2.3	Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	28
2.5.2.4	Determinación de cenizas solubles en agua	29
2.5.3	Control de calidad del extracto alcohólico	29
2.5.3.1	Requisitos organolépticos	29
2.5.3.2	Determinación de densidad relativa	30
2.5.3.3	Índice de refracción.....	30
2.5.3.4	Medición del pH.....	30
2.5.3.5	Determinación de sólidos totales:.....	30
2.5.4	Tamizaje Fitoquímico	31
2.5.4.1	Ensayo de Sudan:	33
2.5.4.2	Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner para alcaloides.....	34
2.5.4.3	Ensayo de Baljet.....	34
2.5.4.4	Ensayo de Borntrager	34
2.5.4.5	Ensayo de Liebermann-Burchard.....	35
2.5.4.6	Ensayo de Catequinas.....	35
2.5.4.7	Ensayo de Resinas:.....	35
2.5.4.8	Ensayo de Fehling	36
2.5.4.9	Ensayo de Espuma:	36
2.5.4.10	Ensayo de Cloruro férrico	36
2.5.4.11	Ensayo de Shinoda	37
2.5.4.12	Ensayo de Antocianidinas	37
2.5.4.13	Ensayo de Mucílagos	37
2.5.4.14	Ensayo de Principios amargos y astringentes.....	37
2.5.5	Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de Piper peltatum L.	38
2.5.6	Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu	38
2.5.7	Determinación de flavonoides totales	38

2.5.8	Actividad Antioxidante in vitro.....	39
2.5.9	Aislamiento de neutrófilos de sangre humana	40
2.5.10	Ensayo de citotoxicidad in vitro con neutrófilos aislados	40
2.5.11	Ensayo antiinflamatorio in vitro con neutrófilos aislados	41
CAPÍTULO III.....		43
3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
<i>3.1</i>	<i>Ensayos de Control de calidad de Droga Cruda</i>	<i>43</i>
<i>3.2</i>	<i>Tamizaje Fitoquímico.....</i>	<i>44</i>
<i>3.3</i>	<i>Control de calidad del extracto alcohólico.....</i>	<i>46</i>
Características Organolépticas		46
<i>3.4</i>	<i>Determinación de Fenoles Totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	<i>47</i>
<i>3.5</i>	<i>Determinación de Flavonoides Totales.....</i>	<i>48</i>
<i>3.6</i>	<i>Actividad Antioxidante in vitro.....</i>	<i>48</i>
<i>3.7</i>	<i>Actividad Citotóxica in vitro</i>	<i>50</i>
<i>3.8</i>	<i>Actividad Anti-inflamatoria in vitro</i>	<i>53</i>
CONCLUSIONES.....		58
RECOMENDACIONES.....		59
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica de <i>Piper peltatum</i> L.	7
Tabla 2-1: Clasificación de los grupos farmacológicos de los AAP/AINEs.....	17
Tabla 1-2: Materiales de laboratorio utilizados.....	22
Tabla 2-2: Equipos utilizados en los diferentes métodos.....	24
Tabla 3-2: Reactivos utilizados en cada método.....	25
Tabla 4-2: Protocolo para la realización del ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Piper peltatum</i> L.	41
Tabla 5-2: Protocolo del ensayo de actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de <i>Piper peltatum</i> L.	42
Tabla 1-3: Resultados obtenidos del Control de Calidad de la droga	43
Tabla 2-3: Resultados obtenidos del Tamizaje Fitoquímico de los extracto etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de <i>Piper peltatum</i> L.	44
Tabla 3-3: Resultados obtenidos en el Control de calidad del extracto alcohólico.....	46
Tabla 4-3: Resultados de la Determinación de Fenoles Totales	47
Tabla 5-3: Resultados de la Determinación de Flavonoides	48
Tabla 6-3: Actividad Antioxidante del extracto hidralcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i>	49
Tabla 7-3: Resultados de la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper</i> <i>peltatum</i>	51
Tabla 8-3: Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper peltatum</i>	54

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Porcentaje de Captación de radicales a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i>	49
Gráfico 2-3: Curva de la concentración inhibitoria media del extracto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i> en la actividad antioxidante.....	50
Gráfico 3-3: Porcentaje de la viabilidad celular obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i>	51
Gráfico 4-3: Curva de la concentración letal media del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i> en la actividad citotóxica.	51
Gráfico 5-3: Representación gráfica de la actividad citotóxica expresada en porcentaje de viabilidad celular obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper peltatum</i>	52
Gráfico 6-3: Porcentaje de la Inhibición Inflamatoria obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de la planta.....	54
Gráfico 7-3: Representación gráfica de la Actividad Anti-inflamatoria expresada en porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i>	55
Gráfico 8-3: Curva de la concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de <i>Piper peltatum</i> en la actividad anti-inflamatoria.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>Piper peltatum</i> L.	6
Figura 2-1: Vías de la Inflamación.....	11
Figura 3-1: Cascada de adhesión leucocitaria.....	14
Figura 1-2: Esquema para elaborar los extractos para el Tamizaje Fitoquímico.	32
Figura 2-2: Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico	32
Figura 3-2: Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico	33
Figura 4-2: Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de acuoso	33

ANEXOS

Anexo A. Análisis Estadístico de la Actividad Citotóxica.

Anexo B. Análisis Estadístico de la Actividad Antiinflamatoria.

Anexo C. Preparación de la droga cruda.

Anexo D. Control de Calidad de droga cruda.

Anexo E. Control de calidad del extracto alcohólico.

Anexo F. Tamizaje Fitoquímico.

Anexo G. Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum* L.

Anexo H. Determinación de Fenoles Totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Anexo I. Determinación de Flavonoides.

Anexo J. Determinación de la Actividad Antioxidante.

Anexo K. Aislamiento de neutrófilos en sangre.

Anexo L. Determinación de la Actividad Anti-inflamatoria.

Anexo M. Determinación de la Actividad Citotóxica.

GLOSARIO

4-NC= 4-Nerolidilcatecol

VIH-1= Cepa o variedad del Virus de Inmunodeficiencia Humana

ug= Microgramos

IC₅₀ = Concentración inhibitoria media

LC₅₀ = Concentración letal media

PLA_{2s}= Fosfolipasa A_{2S}

LC₅₀= Concentración letal media

ADN= Ácido desoxirribonucleico

MCF – 7= Línea celular del cáncer de mama humano

HCT – 8= Línea celular del cáncer de colon humano

B16= Línea celular de melanoma

C3a= Componente del complemento 3a (anafilotoxina)

C5a= Componente del complemento 5a (anafilotoxinas)

IL-1= Interleucina-1

TNF= Factor de necrosis tumoral

IL-6= Interleucina-6

IL-8, IL-12, IL-18, IL-10, IL-3= Interleucinas

TGF-β= Factor de crecimiento transformador beta

GMCSF= Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

LT= Leucotrienos

ACTH= Hormona adrenocorticotropa

AINEs= Antiinflamatorios no Esteroides

COX= Ciclooxygenasa

AAP= Analgésicos

NO= Óxido nítrico

ROS= Especies reactivas de oxígeno

NADPH= Nicotiamida adenina Dinucleótido Fosfato

NADH= Nicotin Adenin Dinucleótido

O₂⁻=Superóxido

PMN= Polimorfonucleares

WST-1=2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt.

MTT= 3-(4, 5-di- methylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

DPPH= 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

FeCl₃= Cloruro Ferrico

NaNO₂= Nitrito de sodio

AlCl₃= Cloruro de Aluminio

NaOH= Hidróxido de Sodio

ppm= Parte por Millón

MHS= Solución Modificada de Hank's

rpm= Revoluciones por minuto

DMSO= Dimetilsulfóxido

HCl= Ácido clorhídrico

mEqAG= Miliequivalentes de Ácido Gálico

mg= Miligramo

mL= Mililitro

nm= Nanómetros

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de Santamaría (*Piper peltatum* L). Preliminarmente, fueron evaluados los parámetros de control de calidad de la droga cruda como del extracto hidroalcohólico. Se identificaron los grupos fitoquímicos más representativos de la especie vegetal mediante el tamizaje fitoquímico respectivo. Se determinaron por espectrofotometría UV-Vis, las cantidades relativas de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en el extracto hidroalcohólico. Además, fue evaluada la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico mediante el método de captación de radicales libres (DPPH). Por último, fueron evaluadas la actividad antiinflamatoria y citotoxicidad *in vitro*, mediante un método colorimétrico basado en la reducción de sales de tetrazolio (WST-1) a formazan sobre neutrófilos aislados. Se determinó que *Piper peltatum* presenta en su composición grupos fitoquímicos representativos como fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, mucílagos, resinas, quinonas, azúcares reductores, triterpenos y esteroides. Además, el extracto hidroalcohólico de *Piper peltatum* contiene una cantidad considerable de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico 30.36 ± 0.96 mg GAE en 0.0125g de extracto, y una cantidad moderada de flavonoides expresados como equivalentes de quercetina 5.64 ± 0.13 mg QE en 0.01g de extracto. Con respecto a la actividad antioxidante esta especie presenta un IC_{50} de 3891.67 mg de extracto/ μ mol de DPPH. En relación a la actividad anti-inflamatoria y citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L., se obtuvo como resultado un $67.56 \pm 0.46\%$ de inhibición inflamatoria y un $51.22 \pm 0.56\%$ de viabilidad celular respectivamente. En conclusión, se puede determinar que la especie *Piper peltatum* L., presenta una actividad antiinflamatoria moderada, aunque inferior a la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico) y una actividad citotóxica baja sobre neutrófilos aislados.

PALABRAS CLAVES: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <SANTAMARÍA (*Piper peltatum*)>, <INHIBICIÓN INFLAMATORIA>, <VIABILIDAD CELULAR>, <NEUTRÓFILOS AISLADOS>, <SAL DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <DISEÑO COMPLETAMENTE ALEATORIO>

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the anti-inflammatory and cytotoxic activity *in vitro* of the hydro-alcoholic extract of leaves of Santamaria (*Piper peltatum* L.). Preliminarily, the parameters of quality control of the crude drug as well the hydro-alcoholic extract were evaluated. It was identified the most representative phytochemical groups of the plant species by the respective phytochemical screening. The relative amounts of phenolic compounds and flavonoids present in the hydro-alcoholic extract were determined by UV-Vis spectrophotometry. In addition, it was evaluated the antioxidant activity of the hydro-alcoholic extract using the method of free radical scavenging (DPPH). Finally, the anti-inflammatory activity and *in vitro* cytotoxicity were evaluated by a colorimetric method based on the reduction of tetrazolium salts (WTS-1) to formazan on isolated neutrophils. It was determined that *Piper peltatum* presents in its composition representative phytochemical groups such as: phenols, flavonoids, tannins, alkaloids, saponins, mucilages, resins, quinones, reducing sugars, triterpenes and steroids. In addition, the hydro-alcoholic extract of *Piper peltatum* contains a considerable amount of total phenols expressed as Gallic acid equivalents 30.36 ± 0.96 mg GAE (Equivalent to Gallic acid) in 0.0125 g of extract, and a moderate amount of flavonoids expressed as quercetin equivalent 5.64 ± 0.13 mg QE (Quercetin equivalent) in 0.01 g extract. With respect to the antioxidant activity, this species presents and IC_{50} (The half maximal inhibitory concentration) of 3891.67 mg of extract/ μ mol of DPPH. In relation to the anti-inflammatory and cytotoxic activity of the hydro-alcoholic extract of leaves of *Piper peltatum* L., obtained as result $67.56 \pm 0.46\%$ of inflammatory inhibition and $51.22 \pm 0.56\%$ of cell viability respectively. In conclusion, it can be determined that the species *Piper peltatum* L. presents a moderate anti-inflammatory activity although lower than the reference substance (acetylsalicylic acid) and low cytotoxic activity on insolated neutrophils.

KEY WORDS: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <SANTAMARIA (*Piper peltatum*)>, <INFLAMMATORY INHIBITION>, <CELL VIABILITY>, <ISOLATED NEUTROPHILS>, <TETRAZOLIUM SALT (WST-1)>, <COMPLETELY RANDOM DESIGN>

INTRODUCCIÓN

Problema de la investigación: ¿Existen diferencias significativas en la inhibición inflamatoria y actividad citotóxica *in vitro* por efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum*?

El estudio de extractos de plantas de uso medicinal en el tratamiento de la inflamación, es de gran interés científico debido a que ofrecen ciertas ventajas en relación a los antiinflamatorios convencionales que se comercializan actualmente, cumpliendo con el efecto terapéutico pero con limitados efectos adversos (Gómez et al. 2011a, pp. 182-217).

El estudio de la actividad citotóxica de especies vegetales resulta esencial para descubrir una nueva fuente de metabolitos secundarios con potencial antitumoral de importancia clínica para encontrar alternativas farmacológicas con productos naturales (Diaz, 2006) (Muñoz & Cuca, 2016, pp. 124-134).

Piper peltatum es una planta muy utilizada en los pueblos amazónicos por su capacidad de tratar edemas, inflamación linfática y enfermedades reumáticas; por lo tanto, esta planta tropical debe ser analizada para corroborar sus propiedades medicinales, especialmente la actividad antiinflamatoria (Puertas et al. 2009a). En la actualidad, se realizaron estudios sobre la actividad antimalárica *in vivo* e *in vitro* de compuestos aislados de esta planta como el 4-nerolidilcatecol, siendo una investigación de elevada importancia médica para tratar enfermedades tropicales (Cruz et al. 2013, pp. 168)(Nogueira et al. 2015, pp. 3271-3280).

El presente trabajo se encuentra dividido en cuatro capítulos que buscan explicar la línea de investigación utilizada y responder a las preguntas del problema de investigación.

- Capítulo I, está representado por el marco teórico que responde a las preguntas epistemológicas en cuanto a la temática de interés, esencialmente sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica que puede presentar *Piper peltatum*. Por lo tanto, se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos científicos que justifiquen la realización de este estudio.
- Capítulo II, señala la metodología de investigación utilizada en los diferentes ensayos propuestos para alcanzar los objetivos de este estudio.

- Capítulo III, se registraron los resultados y discusión de la experimentación realizada, así como los paradigmas académicos relacionados al tema de investigación, comparando la búsqueda bibliográfica del marco teórico con los resultados obtenidos.
- En la parte final se presentan las conclusiones en relación a los objetivos propuestos, resultados e hipótesis analizados; también, se incluye un apartado de recomendaciones respecto a la temática. Además, se encuentra la Bibliografía de los artículos científicos referenciados en el marco teórico sobre las variables de la investigación.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

En la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas se han desarrollado diversos estudios sobre plantas con uso etnobotánico y particularmente de sus metabolitos secundarios que pueden presentar un alto potencial antiinflamatorio, con el fin de encontrar nuevos compuestos de elevada eficacia y seguridad en el tratamiento de enfermedades que cursan con un proceso inflamatorio. Las plantas medicinales son consideradas como una de las formas más antiguas de tratamiento de dolencias.

Existen muchos ejemplos que demuestran con evidencia experimental, el papel de estos metabolitos en el efecto antiinflamatorio y citotóxico, comprobado en diferentes especies de plantas medicinales. Por ejemplo, en la familia de las Piperaceae se realizó el estudio del efecto antiinflamatorio del flavonoide 2"-O-ramnosil 4"-O-metil vitexina, aislado de las hojas de *Piper ossanum*, mediante un ensayo de inflamación crónica en animales de experimentación (*Rattus norvegicus*), obteniendo como resultado una elevada actividad antiinflamatoria sin diferencia significativa frente al control piroxicam utilizado en aquel estudio (Gómez et al. 2011b, pp. 182-217).

En otra especie del género *Piper* se realizó un estudio de actividad citotóxica en líneas celulares tumorales demostrando que todos los extractos de *Piper imperiale* presentan efectos citotóxicos contra la línea celular de cáncer MCF-7 (Díaz et al. 2012a, pp. 4142-4157).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las enfermedades que estimulan un proceso inflamatorio representan uno de los mayores problemas de salud en la actualidad. La mayoría de fármacos que tratan la inflamación provocan efectos colaterales, principalmente el riesgo de desarrollar ulcera péptica y otras complicaciones como hemorragia y perforación de la mucosa gástrica, especialmente cuando estos medicamentos se administran a largo plazo o por un uso indiscriminado de ellos (Lastra Valdés & Ponce 2001, pp. 28-33).

El estudio de la actividad antiinflamatoria en los últimos años ha sido de gran interés científico en el área Farmacología, debido especialmente a la capacidad que tienen ciertos compuestos aislados de especies vegetales como flavonoides, de interferir en la evolución de enfermedades que cursan por un proceso inflamatorio. Estos compuestos podrían lograr su fin terapéutico sin provocar efectos adversos al paciente (Gómez et al. 2011c, pp. 182-217).

Por lo antes mencionado, la importancia de esta investigación está guiada a encontrar nuevos metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria cuyos efectos adversos sean limitados en contraste con los antiinflamatorios convencionales. Con el fin de resolver esta problemática, se realizó el estudio de la planta herbácea *Piper peltatum* L. que pertenece a la familia de las Piperaceae, destacada por diversos estudios etnobotánicos que le atribuyen propiedades medicinales como: rubefaciente, tónico estomacal, emoliente, diurética, y antiinflamatoria (Flores Quisbert 2006, pp. 67-75).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L.

Objetivos Específicos

- Identificar los grupos fitoquímicos representativos presentes en las hojas de *Piper peltatum*.
- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* mediante métodos colorimétricos.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* mediante el modelo de captación de radicales libres (DPPH).
- Evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* sobre neutrófilos aislados.
- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* sobre neutrófilos aislados.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 El Género *Piper*

El género *Piper* pertenece a la familia de las Piperaceae, comprendida por más de 700 especies distribuidas en ambos hemisferios. El género *Piper*, se caracteriza por presentar especies vegetales de tipo arbustos o árboles que pueden llegar a ser leñosos y a veces trepadoras. Además, los tallos usualmente presentan nudos engrosados con hojas enteras que pueden ser simples lobuladas o alternas; con la presencia de nudosidades e inflorescencias en forma de amento (Pino, 2008a, pp. 67-75).

La composición química del género *Piper* se caracteriza una amplia gama de metabolitos secundarios de tipo flavonoide, propenilfenoles, amida, lignanos, kavapironas, neolignanos, taninos, saponinas, glicósidos, terpenoides y otros compuestos fenólicos, ubicados parcialmente en semillas, hojas, corteza del tallo y raíz (Mgbeahuruike et al. 2017, pp. 54-69). Por lo anterior, las especies de este género son reconocidas por sus propiedades biológicas como farmacológicas, tales como antibióticas, antifúngicas, insecticidas, anticancerosas, antiinflamatorias, antimicrobianas y anti-mutágenas; razones por que se enfatiza numerosas investigaciones con especies de este género (Parmar et al. 1997, p. 597-673) (Soto 2015a, pp. 33-43).

1.2 *Piper peltatum* L.

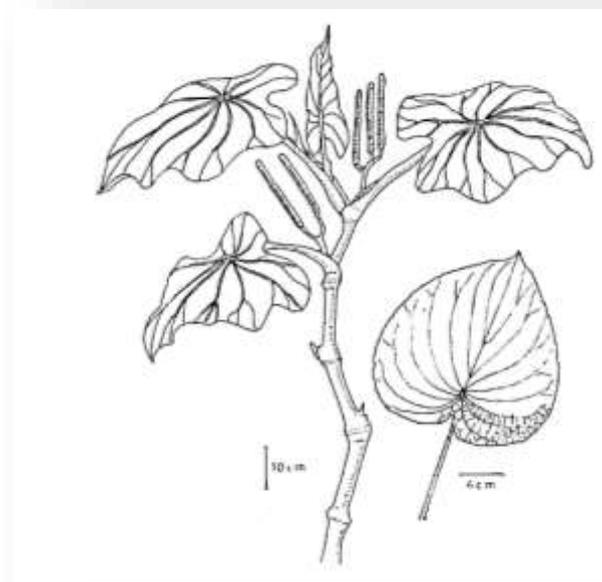


Figura 1-1: *Piper peltatum* L.
Fuente: (Mejía & Renfijo, 2000a)

1.1.1 Descripción Botánica

Piper peltatum es una planta herbácea, considerada también como un sub-arbusto, que puede medir entre 0.5 a 2 metros de altura (Tebbs 1993a). El tallo y pecíolos de esta planta son glabros, en el tallo se pueden observar distintos nodos que pueden llegar a ser leñosos en la base (Madrid & Friedman, 2009, pp. 869-884).

Esta especie presenta hojas cordadas, redondeadas, peltadas y nervadas de color verde pálido, que pueden llegar a medir entre 20-40 cm de largo y de 15-30 cm de longitud, con apariencia membranosa y glandulares (Tebbs, 1993b). Las inflorescencias presentan la característica de encontrarse en espigas de color blanco, organizadas a manera de umbela entre 4 mm de grosor y 5 a 10 cm de largo, y el fruto es sub-globuloso con un tamaño aproximado de 0.5-0.8 mm (Mejía & Renfijo, 2000b).

1.2.1 Sinónimos

Principales sinónimos de esta especie son: *Lepianthes peltata* (L.) Raf.; *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. (Tebbs, 1993c)

1.2.2 Nombres vernáculos

Feya, hoja santamaría, piquina, santamaría, ugudi bagasu, cordoncillo, corarnopan, caapeba, entre otros (Mejia & Renfijo, 2000c)(Puertas et al. 2009b)(Picard et al. 2014, pp. 1500-1507)(Pinto et al. 2006a, p. 205-211).

1.2.3 Clasificación Taxonómica

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

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

Fuente: (Lee & Aparna, 2004)(Kuetz, 2017)

Realizado por: Jahaira Bermúdez

1.2.4 Hábitat

Es una especie común en los sotobosques de bosques húmedos y secundarios, o en matorrales de tierras bajas húmedas, especialmente de regiones tropicales, aproximadamente desde 600 hasta los 1600 metros de altitud (Tebbs, 1993d). Es nativa de México, Centro América, las Antillas y Sudamérica (Pinto et al. 2006, pp. 98-101).

1.2.5 Usos etnomédicos y modo de empleo

La especie *Piper peltatum* L. es conocida popularmente como “Santamaría” o “Cordoncillo”, tiene diferentes aplicaciones terapéuticas siendo requerida por su actividad diurética, antipirética y antiinflamatoria (Soto, 2015b, pp. 33-43). En la medicina tradicional boliviana, peruana y brasileña se utiliza en el tratamiento de patologías hepáticas, inflamatorias e infecciosas (Desmarchelier et al. 1996, pp. 45-51). Algunos de los modos de preparación etnofarmacológicos para emplear las hojas de esta planta son la maceración en agua para el tratamiento de las cefaleas, dolor y fiebre; su cocción para el tratamiento de odontalgias, y su calentamiento y aplicación en el cordón umbilical para expulsar la placenta luego del parto. Otra variante de empleo, es la cocción de la raíz utilizada para disminuir el vómito y como diurético (Mejía & Renfijo, 2000d). La raíz de *Piper peltatum* L. era aplicada como medicina tradicional en la región Amazónica y otras partes de Sudamérica, por medio de infusiones para el tratamiento de la malaria (Rocha et al. 2011, pp. 1181-1188). Internamente esta especie de *Piper* puede estimular al sistema linfático y, además puede usarse para tratar úlceras o quemaduras en la piel (Breitbach et al. 2013).

En la Fitomedicina de la cultura Maya esta planta era empleada para tratar diferentes patologías como dolores uterinos, hemorragias vaginales, diarrea, dolores corporales y tradicionalmente para eliminar los malos espíritus que provocaban la constipación (Hitziger et al. 2016, pp. 61-72). Además las hojas de esta planta se usaban como vermífugas en algunas regiones amazónicas (Moraes et al. 2004a, pp. 15-16).

1.2.6 Composición Química

La especie *Piper peltatum* presenta diversos tipos de metabolitos secundarios, siendo la piperina (una piperamida) uno de los compuestos más representativos fitoquímicamente (Delgado et al. 2013a, pp. 269-282). En *Piper peltatum* L., se aislaron y caracterizaron un gran número de compuestos químicos como amidas, lignanos, neolignanos, hidroquinonas, alcaloides, terpenos, compuestos oxigenados, y derivados del ácido benzoico (Soto 2015c, pp. 33-43). Además, presenta un contenido considerable de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas.

En un estudio se determinó que aceite esencial de hojas de *Piper peltatum* L., presenta mayoritariamente en su composición química: beta-cariofileno, germacreno D, alfa-humuleno, (E)-nerolidol y óxido de cariofileno (Domingos et al. 1999, pp. 479-481) (Moraes et al. 2004b, pp. 15-16). Otro

componente de esta especie vegetal con un alto potencial farmacológico es el 4- Nerolidilcatecol (4-NC) que se encuentra en las raíces, hojas e inflorescencias. También, se aislaron en esta planta nuevos compuestos derivados de catecol con propiedades antivirales denominados peltatol A, B y C (Gustafson et al. 1992a, pp. 2809-2811).

1.2.7 Actividad Farmacológica y Biológica

Con respecto a la actividad farmacológica, las sustancias peltatol A, B, C presentes en la composición química de *Piper peltatum* L., fueron capaces de inhibir la muerte celular inducida por VIH-1 a concentraciones sub-citotóxicas entre 1-10 $\mu\text{g/mL}$ (Gustafson et al. 1992b, pp. 2809-2811). Las fracciones obtenidas a partir del extracto metanólico de *Piper peltatum* L., luego de un fraccionamiento cromatográfico muestra actividad inhibitoria contra tumores inducidos por *Agrobacterium tumefaciens* (Mongellil et al. 1999, pp. 376-378). En otro estudio, se concluyó que los extractos crudos de *P. peltatum* inhiben la actividades miotóxicas de PLA2s, aislados del veneno de las serpientes del género *Bothrops* (Nuñez et al. 2005, pp. 1017-1025).

Las fracciones aisladas obtenidas a partir de un extracto hexánico de hojas de *Piper peltatum* L., poseen una actividad antioxidante representativa con los métodos DPPH y FRAP (Puertas et al. 2009c). En otro estudio del extracto metanólico de esta especie se demostró su actividad antioxidante con un IC_{50} entre 5.0 y 57.3 $\mu\text{g/mL}$ (Desmarchelier, Repetto, et al. 1997, p. 288-296). También, se valoró la actividad antioxidante de esta especie con diferentes extractos mediante el método de quimioluminiscencia, determinando que el extracto metanólico tenía la mayor actividad antioxidante, con una $\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{g/mL}$ (Desmarchelier, Mongelli, et al. 1997a, pp. 85-91). Además, en un artículo científico se evaluó la actividad de reducción del daño oxidativo del ADN, demostrando que el extracto metanólico posee la mayor actividad con una $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$, siendo altamente efectivo para disminuir el daño del ADN (Desmarchelier, Mongelli, et al. 1997, pp. 85-91).

En cuanto a su actividad antiparasitaria, los extractos etanólicos de *P. peltatum* presentaron una baja actividad antiparasitaria en ratones con malaria, tratados por vía oral a 500 mg/kg y por vía subcutánea a 20, 100 y 500 mg/kg de extracto (Amorim et al. 1988, pp. 2809-2811) (Ferreira-da-Cruz et al. 2000, pp. 243-247).

Con respecto a su actividad antimicrobiana, *P. peltatum* por medio de la decocción de las partes aéreas secas, no muestran una actividad *in vitro* contra los siguientes microorganismos patógenos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella gallinarum*, *Mycobacterium gordonae* y *Candida albicans*; pero muestra una débil actividad *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (Pino, 2008b, pp. 67-75). Además, el extracto etanólico de las hojas de *Piper peltatum* L. presenta una baja acción inhibitoria en el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Baquero et al. 2007, pp. 133-136).

En estudios de citotoxicidad, los extractos metanólico y etanólico de raíz presentan actividad citotóxica de moderada a alta contra las líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama humano), HCT-8 (cáncer de colon humano) y melanoma B16 (Pinto et al. 2006b, p. 205-211). Además, el extracto metanólico de *P. peltatum* presenta actividad larvicida *in vitro* contra *Aedes aegypti* (vector de la fiebre del dengue hemorrágico) en una concentración letal media (LC₅₀) de 398 µg/mL (Mongelli et al. 2002, pp. 71-72)

1.3 Inflammation

1.3.1 Definition

La inflamación es un mecanismo fisiopatológico básico de defensa del sistema inmunológico y a la vez complejo que involucra una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares desencadenados por varios estímulos perjudiciales entre los que se incluyen los factores endógenos o exógenos, así como lesiones por agentes mecánicos, fracturas de hueso, distensión muscular, químicos, físicos, biológicos e inmunológicos, etc. (Gómez et al. 2011d, pp. 182-217) (Bordes et al. 2010, pp. 9-12).

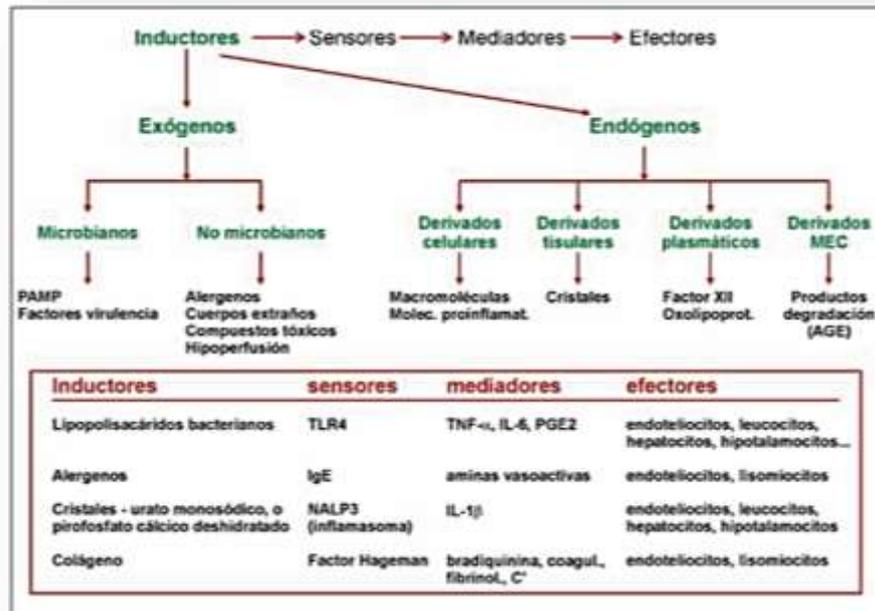


Figura 2-1: Vías de la Inflamación
Fuente: (García, 2008, p. 91-159)

1.3.2 Clasificación de los Tipos de Inflamación

1.1.1.1 Por la duración:

1. *Inflamación Aguda:* este tipo de inflamación se caracteriza por ser de corta duración, radica en una respuesta inmediata que se produce frente al agente perjudicial, provocando la extravasación de líquido y proteínas plasmáticas, así como el desplazamiento de leucocitos especialmente neutrófilos.

2. *Inflamación Crónica:* es un tipo de inflamación de larga permanencia, entre varias semanas o meses, implica la presencia de linfocitos y macrófagos, la propagación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis. Puede originarse como un cuadro evolutivo dado por una inflamación aguda (Gómez et al. 2011e, pp. 182-217).

1.3.2.1 Por la etiología:

1. *Infeciosas:* inducida por microorganismos patógenos como bacterias, parásitos, virus, o por toxinas microbianas.

2. *Traumática*: producida por golpes agudos, acontece con los esguinces.
3. *Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad*: provocadas por alérgenos comunes.
4. *Irradiaciones*: dada por la exposición a agentes químicos y ambientales que provocan este tipo de energía.
5. *Necrosis tisular*: puede darse por la presencia de cuerpos extraños.
6. *Térmicas resultantes*: debido a la exposición excesiva al calor o al frío (Villalba, 2014a, pp. 2261-2265).

1.3.2.2 *Por la localización:*

1. *Focales*: ocasionadas por las infecciones producidas en zonas y órganos específicos.
2. *Diseminadas*: provocada por la expansión de las inflamaciones persistentes, mediante vía canalicular, fistulización o metástasis (Villalba 2014b, pp. 2261-2265).

1.3.3 *Fases de la inflamación*

1. *Fase transitoria aguda*: caracterizada por una vasodilatación específica, hiperemia activa y aumento en la permeabilidad capilar.
2. *Fase subaguda tardía*: comprendida por una etapa de hiperemia pasiva, invasión de leucocitos y fagocitosis.
3. *Fase proliferativa crónica*: caracterizada por la degeneración de tejidos, provocando una lesión endotelial y fibrosis (Gómez et al. 2011f, pp. 182-217).

1.3.4 *Proceso de la Inflamación*

1.3.4.1 *Inflamación aguda local*

Este tipo de inflamación se caracteriza por la microcirculación, y por el traslado de proteínas plasmáticas y leucocitos de la sangre hacia los tejidos. El proceso se encuentra regulado por

diferentes mediadores, que intervienen directamente sobre las poblaciones celulares que se encuentran ubicadas en la zona afectada (Bertha & Robledo, 2008a, pp. 220-222).

1. *Reguladores de proceso:*

- **Mediadores de la inflamación:** intervienen diferentes compuestos como la histamina, eicosanoides, serotonina, bradiginina, quimiocinas, enzimas, factor activador de plaquetas, fibrina, C3a y C5a.
- **Citocinas:** son pequeñas proteínas o glicoproteínas consideradas de alarma, que están comprendidas por las interleuquinas. El IL-1, TNF, IL-6, favorecen el proceso inflamatorio. También participan otras citosinas como las quimioattractantes (IL-8), las incitadoras de la actividad linfocítica (IL-18, IL-12); las supresoras del proceso (IL-10, TGFβ); productoras de células en médula ósea (GMCSF, IL-3) (Garcia 2008) (Bertha & Robledo, 2008b, pp. 220-222).

2. *Etapas del proceso*

- **Quimiotaxis:** es el traslado de una célula a lo largo de un gradiente de concentración, por atracción de una molécula. En el sitio dañado, llegan y se acumula un número considerable de células. Esto acontece por la acción de quimioattractantes como IL-8, lipopolisacáridos C5a, leucotrieno (LT) B4, lipopolisacáridos, histamina y los restos de fibrina y colágeno. Las primeras células que se atraen son los neutrófilos, y luego participan los linfocitos, monocitos y fagocitos.
- **Aumento del diámetro vascular:** se produce por la acción de sustancias inflamatorias (bradiginina, eicosanoides, triptasas e histamina), que son generadas por los mastocitos, las células endoteliales activadas y basófilos; que provocan el aumento del flujo sanguíneo hacia la zona afectada generando la elevación de la temperatura y rubor.
- **Aumento de la permeabilidad vascular:** se produce debido a la dilatación capilar permitiendo la entrada de líquido y proteínas sanguíneas. Estas se acumulan y originan un edema (tumor) en la zona afectada. Además, genera dolor debido a la acción de la bradiginina, la distensión de tejidos y por lo antes mencionado.
- **Adherencia y rodamiento celular:** los neutrófilos se unen a las células endoteliales a través de las selectinas (baja adherencia), y posteriormente los monocitos. Los leucocitos se desplazan por las células endoteliales de las vénulas post-capilares, este proceso es conocido como rodamiento. Después las quimiocinas (IL-8) se conectan a los leucocitos en rodamiento y provocan la adherencia de integrinas (alta adherencia); a su vez el TNF e IL-1 actúan sobre las células endoteliales que aumentan la expresión de moléculas unidoras para formar una unión fuerte entre las integrinas de los leucocitos (Bertha & Robledo, 2008c, p. 220-222).

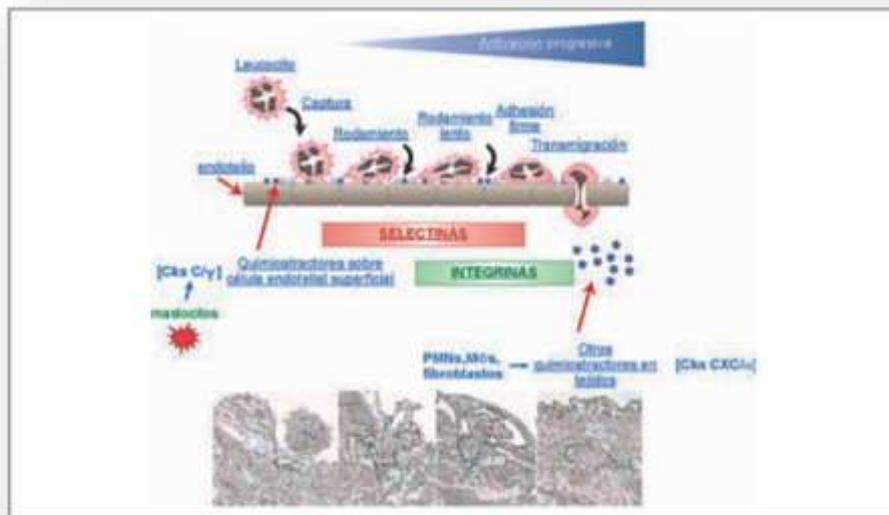


Figura 3-1: Cascada de adhesión leucocitaria

Fuente: (García, 2008, pp. 91-159)

- Estimulación de la vía extrínseca de coagulación: se produce por la formación de fibrina y un estado pro-coagulante que impiden la proliferación de microorganismos patógenos a circulación sanguínea.
- Transmigración o diapédesis celular: es el rodamiento de los leucocitos sobre las células endoteliales, y termina con el paso de los leucocitos hacia el tejido inflamado o foco infeccioso. Los leucocitos pasan a través de las uniones intercelulares y también de manera transcelular para llegar a la zona afectada. Los leucocitos que llegan al tejido inflamado son guiados principalmente por los quimioatractantes (creados en el tejido inflamado). En el foco de la inflamación, las células fagocíticas endocitan al antígeno, convirtiéndolo en pequeños péptidos, que enlazados a moléculas del complejo de histocompatibilidad pueden ser expuestos ante los linfocitos T, incitando la participación de la inmunidad específica, potencializando la repuesta inmune del organismo (Bertha & Robledo, 2008d, pp. 220-222).

1.1.1.2 *Inflamación sistémica*

Las citocinas al ser liberadas en elevadas cantidades, pueden actuar sobre otros órganos lo que provocarían una reacción sistémica.

- Síntesis de proteínas del período agudo: el hígado al ser estimulado por la IL-6 puede sintetizar elevadas cantidades los factores requeridos para destruir lo agentes patógenos y modificar la inflamación. Proteínas: fibrinógeno, C reactiva, haptoglobina, lectina unidora de manosa, entre otras.

- Cambios endocrinos: se produce el aumento de la secreción de hormonas tiroideas, cortisol, glucagón, ACTH, catecolaminas; además se reduce la secreción y acción de las citosinas consideradas inflamatorias.
- Aumento del catabolismo de las proteínas y grasas: El TNF permite la movilización de aminoácidos del músculo hacia el hígado para su utilización, generando pérdida de peso corporal.
- Leucocitosis: aumento de la cantidad de leucocitos circulantes, provocada por la liberación de leucocitos ubicados las paredes de los vasos sanguíneos o por la producción de células en la médula ósea.
- Fiebre: las citosinas inflamatorias, el catabolismo y los productos celulares provocan el aumento de la temperatura corporal (Bertha & Robledo, 2008e, pp. 220-222).

Si el proceso inflamatorio termina, varias sustancias intervienen en la regulación. Las citosinas reguladoras IL-10 y TGF β , inhiben la acción de IL-1, IL-6 y TNF, y la respuesta inmune a los antígenos. Consecuentemente, se promueve la cicatrización para reparar el tejido dañado. En caso de un proceso crónico, dando paso a la destrucción tisular provocando la pérdida de la funcionalidad como daño orgánico y sistémico (Bertha & Robledo, 2008f, pp. 220-222).

1.3.5 *Manifestaciones de la Reacción Inflamatoria*

1. *Dolor*: el aumento del dolor se debe a la presión del líquido sobre las terminaciones nerviosas y a la irritación nerviosa provocada.
2. *Fiebre*: considerada con una respuesta común de la inflamación inducida por una variación del centro regulador de la temperatura a nivel del hipotálamo.
3. *Rubor*: enrojecimiento progresivo de la piel estimulado una dilatación de los vasos de la zona afectada.
4. *Hinchazón o Tumor*: se debe a la acumulación anormal de fluidos en las áreas extravasculares presentes en foco de la inflamación.
5. *Disminución de la funcionalidad* (Hall et al. 2001b)(Martínez & Garrido, 2013, p. 41-53).

1.4 Antiinflamatorios

Los Antiinflamatorios están diseñados para combatir la inflamación ocasionada por diferentes patologías que pueden derivar de fracturas, estomatitis, reumatismo y lesiones urinarias como genitales, entre otros. (Hall et al. 2001c).

1.4.1 Medicamentos Antiinflamatorios Esteroideos o Glucocorticoides

Son considerados como los más potentes entre los antiinflamatorios, debido a que actúan contra la inflamación por diversas vías. Estos medicamentos actúan en las siguientes rutas: reducción del número y activación de eosinófilos (apoptosis) y reducción algunos de sus factores quimiotácticos (IL-3 y 5), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eotaxina y la citoquina. De la misma forma, intervienen en la proliferación de los leucocitos T (Gómez et al. 2011g, pp. 182-217).

1.4.2 Analgésicos, Antipiréticos, Antiinflamatorios no Esteroideos (AINEs)

Los Antiinflamatorios no Esteroideos, son medicamentos con estructura química compleja que preliminarmente impiden la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima COX. Aparte de suprimir los signos y síntomas que se producen en la inflamación. Además, pueden ejercer acciones analgésicas como antipiréticas (Gómez et al. 2011h, pp. 182-217).

1.4.2.1 Clasificación de los AAP/AINEs

Tabla 2-1: Clasificación de los grupos farmacológicos de los AAP/AINEs

GRUPOS FARMACOLÓGICOS	FÁRMACOS
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico Acetilsalicilato de lisina Diflunisal Fosfosal
Paraminofenoles	Paracetamol Metamizol
Pirazolonas y afines	Propifenazona Fenilbutazona Feprazona
Derivados indolacéticos	Indometacina Proglumetacina Sulindaco
Derivados arilacéticos	Aceclofenaco Diclofenaco Nabumetona Ketorolaco
Derivados arilpropiónicos	Butibufeno Dexibuprofeno Dexketoprofeno Flurbiprofeno Ibuprofeno Ketoprofeno Naproxeno
Fenamatos	Ácido meclofenámico Ácido mefenámico Ácido niflúmico Morniflumato
Oxicams	Lornoxicam Meloxicam Piroxicam Tenoxicam
Coxib	Celecoxib Parecoxib Valdecoxib
Otros	Isonixina Tetridamina

Fuente: (Gómez et al. 2011i, pp. 182-217)

1.4.2.2 Efectos Adversos:

- Efectos a nivel Sistema Nervioso Central: adormecimiento, cefalea, mareo e insomnio.
- Efecto hipertensivo: los AINES pueden producir un incremento de la presión arterial. Además pueden antagonizar la acción de los hipertensivos en especial de los betas bloqueadores y dilatadores de los vasos sanguíneos.
- Efectos a nivel hematológico: neutropenia, anemia, trombocitopenia y eosinofilia.
- Efecto a nivel pulmonar: La neumonitis, alveolitis, infiltrado pulmonar y fibrosis pulmonar.
- Efecto a nivel renal: pueden provocar nefritis, falla renal, síndrome nefrotóxico, retención de fluido y de sodio.

- Hipersensibilidad: pueden inducir rash cutáneo, urticaria, angioedema, rinitis, broncoconstricción y shock anafiláctico en los casos más severos (Hall et al. 2001d).

1.5 Compuestos Antiinflamatorios de origen natural

1.5.1 Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan en su estructura química un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo. Estos son destacados por su diversidad de compuestos, que comprende desde moléculas de estructura sencilla hasta polímeros complejos (taninos, lignina) (Ávalos & Elena 2009a, pp. 119-145). Por ejemplo, el ácido benzoico es considerado como una de las estructuras más sencilla, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos como el cafeico, cumárico, ferúlico y cinámico; comunes en la composición química de diversas plantas. Los compuestos fenólicos debido a su diseño estructural pueden exhibir numerosas propiedades farmacológicas como bactericidas, fungicidas, antivirales, protectores cardiovasculares, antioxidantes, anti-estrogénicos, anti-inflamatorios, anti-carcinógenos y anti-mutagénicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Bedascarrasbure et al. 2004, pp. 369-372)(Diaz et al. 2012b, pp. 4142-4157).

1.5.2 Flavonoides

Los flavonoides son parte de una familia de compuestos polifenólicos que se caracterizan por una estructura común de benzo- γ -pirona y se encuentran ampliamente presentes en la naturaleza. Estos se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, entre las principales se encuentran las antocianinas, flavonoles, flavonas e isoflavonas (Ávalos & Elena, 2009b, pp. 119-145). Los flavonoides son responsables del buen funcionamiento de las plantas y apreciados por los múltiples beneficios hacia la salud humana (Trueba, 2003, pp. 48-57). Los flavonoides son altamente estudiados por sus diversas propiedades farmacológicas como su capacidad antioxidante, útiles para tratar enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios y desórdenes cardiovasculares (Benavente & Castillo, 2008a, pp. 6185-6205). También, se determinó en algunos estudios científicos otras aplicaciones farmacológicas como actividad hepatoprotectora, antialérgica, antitrombótica, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, efectos sobre la agregación de plaquetas enfermedades cerebrales (Benavente & Castillo 2008, pp. 6185-6205).

1.6 Modelos de evaluación *in vitro* de la Actividad Antiinflamatoria

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) tienen un papel muy importante modulando la iniciación y persistencia de la respuesta inflamatoria. Los macrófagos modulan la inflamación sintetizando mediadores biológicos como prostaglandinas y NO, que exhiben efectos inflamatorios como cardiovasculares.

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los macrófagos reconocen a los estímulos de membrana por la síntesis y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS); este proceso es conocido como estallido oxidativo provocado por el incremento en la recaptación de O₂, seguida por la reducción de un e⁻ de oxígeno a superóxido (O₂⁻) por medio del uso de nicotiamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o la nicotin adenin dinucleótido (NADH) participando como el donante del e⁻, durante una reacción de destrucción por la oxidasa dependiente de NADPH (Beckman et al. 1990, pp. 1620-1624). Ante lo señalado, los modelos de estudios *in vitro* se realizan en células leucocitarias y en macrófagos para evaluar la actividad Antiinflamatoria (Tan & Berridge, 2000a, pp. 59-68).

1.6.1 Ensayos *in vitro* colorimétricos con sales de tetrazolio

Este ensayo *in vitro* se da con un estallido mediado por los neutrófilos (granulocitos), medido espectrofotométricamente e histológicamente mediante el uso de sales de tetrazolio, el mismo que se disminuye intracelularmente a formazan soluble, reacción que es mediada por oxidasa dependiente de NADPH. Los ensayos realizados con WST-1 son métodos colorimétricos modificados que permite medir la reducción de sales de tetrazolio a compuestos de formazan soluble coloreados por succinato-tetrazolim reductasa en presencia de neutrófilos aislados activados. Además, este método es destacado por presentar mayor sensibilidad debido a su solubilidad en comparación con el método MMT (Tan & Berridge, 2000b, pp. 59-68). El uso de WST-1 tiene ventajas por exhibir la ráfaga respiratoria en un fondo extremadamente bajo y alta sensibilidad debido a su baja masa molecular, y el alto coeficiente de extinción molar de formazan reducido, que se disminuye eficazmente por la membrana plasmática NADPH-oxidasa de los neutrófilos activados (Berridge & Tan, 1998a, pp. 74-82).

1.7 Viabilidad Celular para evaluar la Actividad Citotóxica *in vitro*

La citotoxicidad es definida como la capacidad de ciertos compuestos de provocar una alteración en las funciones celulares básicas induciendo un daño en las células (José et al. 2013, pp. 29-82). Un ensayo de citotoxicidad *in vitro* ideal, debe poseer algunas características como ser rápida, simple, eficaz, reproducible, segura, económica, sensible, efectiva al medir la población celular viable y, que no manifieste obstrucción con la muestra a evaluar. Existen diferentes métodos de citotoxicidad *in vitro* (Anoopkumar et al. 2005a, pp. 945-947), como los métodos de colorimétricos de sulforrodamina B y cristal violeta, que colorean elementos específicos de las células permitiendo la medición de restos celulares luego de un período de incubación. Otro método, son los detectores de liberación de elementos constitutivos celulares que evalúan la actividad de enzimas como el lactato deshidrogenasa. También, se utiliza el método colorimétrico que mide la función metabólica de las células utilizando las sales de tetrazolio (Anoopkumar et al. 2005b, p. 945-947)(Escobar et al. 2010, pp. 67-74).

1.7.1 Estudios *in vitro* colorimétricos con sales de tetrazolio

Las sales de tetrazolio se emplean en múltiples estudios citotoxicidad con el fin de evaluar metabólicamente las células viables en una muestra. El método colorimétrico al cumplir con algunas condiciones específicas se emplea en la medición de la citotoxicidad, la proliferación celular y la apoptosis, mediante conversión de sales de tetrazolio a cristales de formazan soluble provocada por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas en cambio las mitocondrias de las células muertas no respiran (Berridge & Tan, 1998b, pp. 74-82). Las sales de tetrazolio más utilizadas para evaluar la citotoxicidad es el WST-1 debido a su solubilidad, se transforman en formazan mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa (Ishiyama et al. 1996a, p. 1548-1520).

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de la Investigación

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales y el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Identificación del material vegetal

Para la identificación de la especie, se tomó muestras de material vegetal en el sitio de recolección, las mismas que fueron identificadas en el Ing. Jorge Caranqui encargado del Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.3 Recolección del material vegetal

Las muestras vegetales se recolectaron en la comunidad La Unión del cantón El Carmen de la provincia de Manabí, ubicación: Latitud: 0° 16' 11'' sur y Longitud: 79° 25' 26'' oeste.

2.4 Materiales, equipos y reactivos

2.4.1 *Material Vegetal*

Se utilizaron las hojas de la planta *Piper peltatum* L.

2.4.2 *Material Biológico*

Neutrófilos aislados obtenidos a partir de sangre de un paciente voluntario sano.

2.4.3 *Material farmacológico*

Ácido Acetilsalicílico.

2.4.4 *Materiales de laboratorio utilizados*

Tabla 1-2: Materiales de laboratorio utilizados

Técnica	Materiales
Control de Calidad de materia prima	Pinzas para cápsulas
	Trípode
	Embudo
	Piseta
	Vidrio reloj
	Desecador
	Crisoles de Porcelana
	Reverbero
	Vasos de precipitación
	Papel Filtro
Tamizaje Fitoquímico	Tubos de ensayo
	Pinzas para tubos de ensayos
	Papel Filtro
	Pipetas de 10 mL, 5 mL y 1 mL
	Frasco ámbar de 1000 mL
	Gradilla
Control de calidad del extracto alcohólico	Frasco ámbar de 1000 mL
	Picnómetro
	Probeta de 50 mL
	Vaso de precipitación
	Cápsula de porcelana
	Pinza para cápsula
	Embudo Büchner de vidrio
	Matraz Kitasato
	Mangueras

Obtención del extracto Hidralcohólico Liofilizado	Embudo
	Vasos de precipitación
	Papel Filtro
	Espátula
	Frasco Ámbar de 1000 mL
	Pipetas
Cuantificación de fenoles y flavonoides totales	Micropipeta de 100 μ L y 1000 μ L
	Pipeta de 5 mL y 10 mL
	Balón de aforo de 25 mL y 100 mL
	Cronometro
	Piseta
	Vasos de precipitación
	Tubos de ensayo
	Puntas amarillas y azules para las micropipetas
	Papel Aluminio
Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>	Micropipeta de 100 μ L
	Gradilla
	Papel aluminio
	Balón aforado de 250 mL
	Tubos de ensayo
	Pipetas graduadas de 5 mL
Actividad Antiinflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i>	Micropipetas de 1000 μ L
	Micropipetas de 100 μ L
	Micropocillos
	Placa para micropocillos
	Jeringuillas de 3 mL, 5 mL, 10 mL y 20 mL
	Tubos de ensayo
	Vasos de precipitación
	Gradillas
	Cámara de Neubauer
	Guantes de látex
	Mascarilla
	Cofia
	Mandil
	Puntas para pipetas de 100 μ L y 1000 μ L
Algodón	
Espátula	

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

2.4.5 Equipos

Tabla 2-2: Equipos utilizados en los diferentes métodos

Técnica	Equipos
Control de Calidad de materia prima	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Balanza analítica
	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
	Estufa Memmert SNB400
	Desecador
	Sonicador Branson 2510
Control de calidad del extracto alcohólico	Refractómetro
	pH-metro
Obtención del extracto Hidralcohólico Liofilizado	Bomba de presión al vacío
	Balanza analítica
	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
	Congelador
	Liofilizador Thermo Scientific
Cuantificación de fenoles y flavonoides totales y Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Balanza analítica
	Vórtex mixer MRC S1 - 100
Ensayo antiinflamatorio y citotóxico <i>in vitro</i>	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Balanza analítica
	Estufa Memmert SNB400
	Centrifuga

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

2.4.6 Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos utilizados en cada método

Técnica	Reactivos
Control de Calidad de materia prima	Agua Destilada
	Ácido clorhídrico al 10%
Tamizaje Fitoquímico	Etanol
	Agua destilada
	Éter Etilico
	Reactivo Sudan III
	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Mayer
	Reactivo de Wagner
	Reactivo de FeCl ₃
	Reactivo de Fehling A y B
	Cloruro de Sodio
	Reactivo de Borntrager
	Ácido clorhídrico concentrado
	Ácido clorhídrico al 1%
	Reactivo de Baljet
	Cloroformo
	Anhídrido acético
	Ácido sulfúrico concentrado
	Hidróxido de sodio al 5%
	Cloruro Férrico
	Cinta de magnesio metálico
Reactivo para Catequinas	
Alcohol amílico	
Carbonato de sodio	
Control de calidad del extracto alcohólico	Etanol
	Agua destilada
Obtención del extracto Hidralcohólico Liofilizado	Etanol
	Agua destilada
Determinación de Fenoles Totales	Agua destilada
	Reactivo de Folin Ciocalteu
	Carbonato de Sodio al 7,5%
	Metanol
Cuantificación de flavonoides totales	Metanol
	Agua destilada
	NaNO ₂ al 5%
	AlCl ₃ al 10%
	NaOH

Actividad Antioxidante <i>in vitro</i>	Metanol
	Reactivo DPPH
	Agua Destilada
Actividad Antiinflamatoria y citotóxica <i>in vitro</i>	Agua Destilada
	Ficoll Paque
	Dimetilsulfóxido
	Zimozan A
	Reactivo WST-1
	Solución Modificada de Hans
	Tritón X-100
	Cloruro de Amonio
	Heparina Sódica

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

2.5 Técnicas y Métodos

2.5.1 Preparación de la Droga cruda

Las hojas de *Piper peltatum* L., fueron acondicionadas y secadas en estufa a 40 °C, luego se pulverizaron en un molino. La droga molida fue almacenada en un frasco ámbar de boca ancha (Puertas et al. 2009d).

2.5.2 Parámetros de control de calidad de droga cruda

Se realizaron los diferentes ensayos por triplicado para determinar la precisión de cada ensayo, teniendo como finalidad garantizar la calidad de la droga utilizada. Los ensayos realizados fueron los siguientes:

- *Determinación del contenido de humedad:* determinación de la pérdida de humedad por desecación en estufa.
- *Determinación de cenizas totales:* determinación en seco.
- *Determinación de cenizas solubles en agua:* método de calcinación.
- *Determinación de cenizas insolubles en Ácido Clorhídrico:* método de calcinación (Miranda, 2006a).

2.5.2.1 *Determinación del contenido de humedad*

Es un ensayo necesario para determinar la calidad de la droga cruda, midiendo el exceso de agua contenido que puede aumentar el riesgo de contaminación microbiana y de igual forma se puede producir una hidrólisis de los componentes de la droga, provocando su deterioro.

Procedimiento:

Se pesaron $2 \text{ g} \pm 0.5 \text{ mg}$ de droga cruda seca y molida en una cápsula de porcelana previamente tarada y luego se colocó la cápsula en la estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas. Después, se pesó la cápsula al pasar 15 minutos en el desecador para llegar a temperatura ambiente y nuevamente se llevó a la estufa durante una hora más. Posteriormente, se pesó hasta obtener masa constante. Para obtener el resultado se realizó un cálculo con los pesos obtenidos para determinar el contenido de humedad de la droga cruda. Ecuación utilizada:

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

Donde:

H = pérdida en peso por desecación.

M = masa de la cápsula vacía.

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g).

M₂ = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

2.5.2.2 *Determinación de cenizas totales*

Permite determinar el contenido total de minerales de la muestra de la droga cruda; siendo el residuo inorgánico que queda tras la eliminación de los compuestos orgánicos de la muestra seca.

Procedimiento:

Se pesó $2 \text{ g} \pm 0.5 \text{ mg}$ de droga cruda molida y seca; esta se ubicó en un crisol de porcelana tarado. La muestra en el crisol se carbonizó en un reverbero, luego fue colocada en una mufla a $700 \text{ }^\circ\text{C}$ durante dos horas para su incineración. Transcurrido ese tiempo, el crisol fue trasladado en el desecador hacia la estufa a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Después, el crisol a temperatura ambiente se

pesó hasta obtener masa constante. Para obtener los resultados se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

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

Donde:

%C = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g).

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

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

2.5.2.3 *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Este ensayo es útil para determinar el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico que contiene la droga vegetal (materia arenosa).

Procedimiento:

En las cenizas totales obtenidas anteriormente, se añadió 3 mL de HCl al 10% y se calentaron en un crisol de porcelana cubierto con un vidrio reloj a baño maría durante 10 minutos, luego se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente uniéndolo con el contenido del crisol. Posteriormente, esto se filtró y el residuo fue lavado con agua caliente repetidamente, hasta que la solución filtrada al colocarle dos gotas de nitrato de plata 0.1 M no indique la presencia de cloruros. Luego la solución fue desecada en una estufa a 105 °C por un determinado tiempo y después fue transferido al crisol de porcelana utilizado para su posterior incineración en la mufla a 700 °C durante 2 horas. Inmediatamente, el crisol se trasladó al desecador durante 15 minutos hasta llegar a temperatura ambiente y finalmente, se pesó repetidamente hasta obtener masa constante. Para obtener los resultados se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

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

Donde:

%B = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M = masa del crisol vacío (g).

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

M_2 = masa del crisol con las cenizas ácido clorhídrico (g).

2.5.2.4 *Determinación de cenizas solubles en agua*

Este ensayo permite determinar la cantidad de material inorgánico que existe en las cenizas totales.

Procedimiento:

Se colocó 15 mL de agua en el crisol de las cenizas totales obtenidas; luego el crisol fue cubierto con un vidrio reloj y colocado en baño maría durante 5 minutos. Posteriormente, esto fue filtrado y el papel filtro fue ubicado dentro del crisol hasta su carbonización y luego, se colocó en una mufla a 700 °C durante 2 horas. Trascurrido el tiempo el crisol fue trasladado a una estufa a 105 °C durante 15 minutos. Al salir el crisol de la estufa, se lo colocó en el desecador y se pesó hasta obtener masa constante (Miranda, 2006b). Para obtener los resultados se realizó el cálculo con la siguiente fórmula:

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

Donde:

$\%Ca$ = porcentaje de cenizas solubles en agua.

M = masa del crisol vacío (g).

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

M_2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

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

2.5.3 *Control de calidad del extracto alcohólico*

2.5.3.1 *Requisitos organolépticos*

- Determinación de Olor
- Determinación del Color
- Determinación del Sabor
- Determinación del Aspecto

2.5.3.2 *Determinación de densidad relativa*

Para determinar la densidad relativa, se pesó el picnómetro a 25 °C y se llenó con la porción de ensayo conservándolo a 25 °C durante 15 minutos, luego secó exteriormente y se pesó el picnómetro. De la misma manera se realizó con agua destilada a 25 °C. Para calcular el resultado se utilizaron los datos obtenidos con la siguiente fórmula:

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

Donde:

M₁: Peso del picnómetro con la muestra (g).

M₂: Peso del picnómetro con el agua (g).

M: Peso el picnómetro vacío (g).

2.5.3.3 *Índice de refracción*

En este ensayo se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición del refractómetro, y se enfocó la luz por medio del espejo del instrumento, de modo tal, que la misma incida sobre la entrada del prisma de medición. Respectivamente, se enfocó para observar el resultado del índice de refracción.

2.5.3.4 *Medición del pH*

Se midió el extracto analizado con el medidor de pH digital.

2.5.3.5 *Determinación de sólidos totales:*

Para el ensayo se tomó 5 mL del extracto alcohólico y se colocó en una cápsula previamente tarada, y se evaporó en baño maría. Luego se colocó la cápsula en la estufa a 105 °C durante 3 horas aproximadamente, se midió el peso de la cápsula cuando llegó a temperatura ambiente hasta tener peso constante (Miranda 2006c). Para obtener los resultados se utilizó la siguiente fórmula:

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

Donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo (g).

P= masa de la cápsula vacía (g).

V= volumen de la porción de ensayo.

2.5.4 Tamizaje Fitoquímico

Los ensayos de tamizaje fitoquímico permiten identificar los metabolitos primarios como secundarios que posee la droga vegetal mediante diferentes reacciones de coloración o precipitación.

Para la elaboración de los extractos para el tamizaje fitoquímicos: Se pesó exactamente 30 g de la droga cruda de hojas de *Piper peltatum*, se realizó la extracción en 150 mL de solvente, y se realizó una extracción de polaridad creciente con éter etílico, etanol y por último agua (Soto, 2015d, pp. 105-116). El procedimiento se señala en el siguiente esquema:



Figura 1-2: Esquema para elaborar los extractos para el Tamizaje Fitoquímico.
Fuente: (Miranda, 2006d)

Posteriormente, en cada extracto se procedió a realizar sus respectivos ensayos basados los esquemas de Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006e). A continuación se detalla:

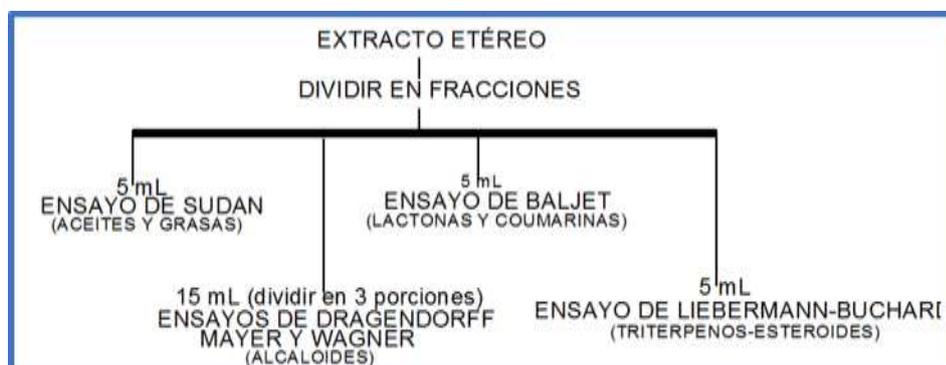


Figura 2-2: Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico
Fuente: (Miranda, 2006f)



Figura 3-2: Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico
 Fuente: (Miranda, 2006g)

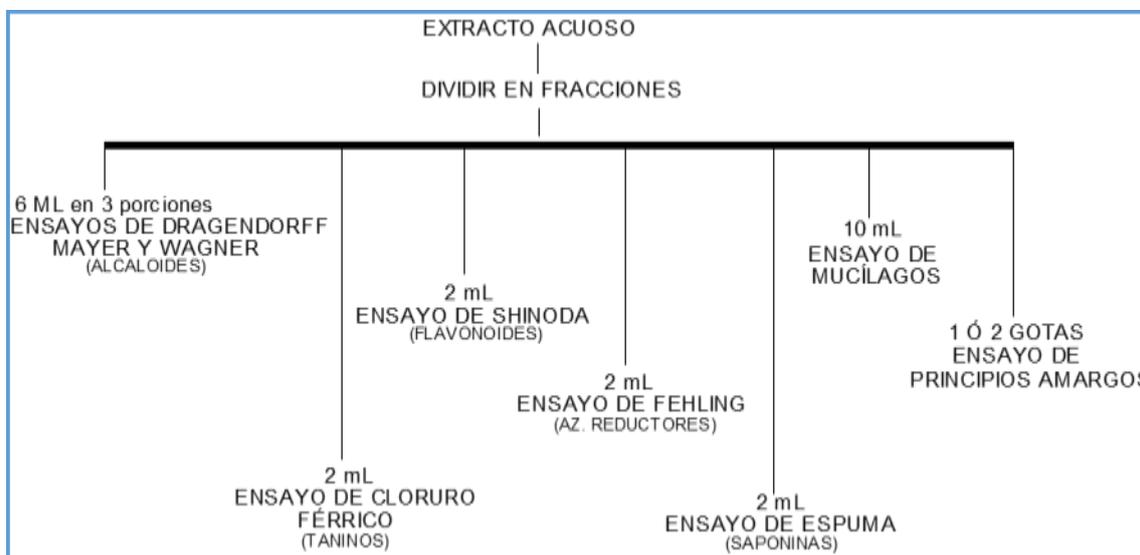


Figura 4-2: Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de acuoso
 Fuente: (Miranda, 2006h)

2.5.4.1 *Ensayo de Sudan:*

Este ensayo permite identificar la presencia de compuestos grasos en el extracto etéreo. A la muestra del extracto etéreo se le añadió 1 mL del reactivo Sudan III y se calentó en baño de agua hasta evaporación del solvente.

Respuesta Positiva: si aparecen gotas o una película de color rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo utilizado.

2.5.4.2 *Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner para alcaloides*

Estos ensayos permiten reconocer en un extracto la presencia de alcaloides de manera cualitativa.

Procedimiento:

- En el extracto de éter etílico: la muestra del extracto se evaporó en baño maría y el residuo se redisolvió en 1 mL HCl al 1%.
- En el extracto alcohólico y acuoso: la muestra del extracto se le añade 1 gota HCl concentrado, luego se calentó suavemente y se dejó enfriar hasta que se acidifique.

Para el ensayo de Dragendorff al tener la solución ácida en cada extracto, se le añadió 3 gotas del reactivo Dragendorff. De igual forma en el ensayo de Wagner al obtener la solución ácida de cada extracto, se añadió 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner. En el ensayo de Mayer, en cambio, al obtener la solución ácida, se colocó una pizca cloruro de sodio, se agitó y filtró; luego se colocó 2 a 3 gotas del reactivo de Mayer.

Resultados positivos: Si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++). En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, se puede encontrar en el extracto acuoso al obtener estos resultados: turbidez o precipitado, en todos los casos, ya que un resultado (+) puede deberse a una extracción incompleta de bases primarias, secundarias y terciarias.

2.5.4.3 *Ensayo de Baljet*

Este ensayo permite determinar la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, especialmente cumarinas, pero también puede ser positivo para otros compuestos de este grupo. Los extractos que no son alcohólicos, fueron evaporados en baño maría y se disolvieron en un 1 mL de alcohol y luego se adicionó 1 mL del reactivo.

Resultado positivo: coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente.

2.5.4.4 *Ensayo de Borntrager*

Esta prueba es útil para determinar la presencia de quinonas en el extracto analizado. Si la muestra del extracto no se encontraba en cloroformo, se procedió a evaporar en baño maría y luego el residuo,

se disolvió en 1 mL de cloroformo. Después se añadió 1 mL de hidróxido de sodio al 5%. Rápidamente, se agitó logrando la mezcla de las fases y se dejó en reposo hasta su separación.

Resultado positivo: Si la fase superior (acuosa alcalina) tiene coloración rosada (++) o coloración roja (+++).

2.5.4.5 *Ensayo de Liebermann-Burchard*

Esta prueba permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides. Si la muestra del extracto no se encontraba en cloroformo, se evaporó en baño maría y el residuo se disolvió en 1 mL de cloroformo. Después, se añadió 1 mL de anhídrido acético y se mezcló. Luego se colocó 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado cuidadosamente.

Resultado positivo: cambio de coloración: rosado-azul muy rápido, verde intenso-visible aunque rápido y verde oscuro-negro al final de la reacción. Se puede diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras provocan la coloración azul o azul verdoso, mientras que las segundas inducen el rojo, rosado o púrpura.

2.5.4.6 *Ensayo de Catequinas*

Mediante un capilar se colocó una pequeña cantidad de extracto sobre papel de filtro y sobre la mancha se aplicó la solución de carbonato de sodio.

Resultado positivo: observación de una mancha verde carmelita ante la luz UV.

2.5.4.7 *Ensayo de Resinas:*

En este ensayo se adicionó 10 mL de agua destilada en los 2 mL de la solución alcohólica.

Resultado positivo: presencia de un precipitado.

2.5.4.8 *Ensayo de Fehling*

Este ensayo permite el reconocimiento de azúcares reductores en los extractos. Si la muestra del extracto no se encontraba en agua, se evapora en baño maría y el residuo se disolvió en 1-2 mL de agua. Luego se adicionó 2 mL del reactivo de Fehling y se calentó en baño maría durante 5 a 10 minutos.

Resultado positivo: coloración de rojo o un precipitado rojo.

2.5.4.9 *Ensayo de Espuma:*

Esta prueba permite determinar la presencia de saponinas de tipo esterooidal como triterpénica en un extracto. La muestra del extracto se diluyó con 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

Resultado positivo: si aparece espuma en la superficie del líquido por más de 2 mm de altura durante 2 minutos.

2.5.4.10 *Ensayo del Cloruro férrico*

Este ensayo permite determinar la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. En el extracto alcohólico se puede determinar tanto fenoles como taninos. A la muestra del extracto alcohólico se le adicionó 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina. En el extracto acuoso se determina fundamentalmente taninos. A la muestra del extracto acuoso se le añadió acetato de sodio y 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina.

Resultado positivo:

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

2.5.4.11 *Ensayo de Shinoda*

El ensayo permite determinar la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. La muestra de extracto se diluyó con 1 mL de HCl concentrado y, se colocó un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después, de la reacción se esperó por 5 minutos, se añadió 1 mL de alcohol amílico, luego se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que se separen fases.

Resultado positivo: el alcohol amílico se torna de color amarillo, naranja, carmelita o rojo.

2.5.4.12 *Ensayo de Antocianidinas*

Se colocó 1 mL de HCL concentrado en los 2 mL del extracto etanólico y se calentó por 10 min. Se enfrió y se adicionó 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Luego se agitó y se dejó separar en dos fases.

Resultado positivo: Coloración rojo a marrón en la fase amílica.

2.5.4.13 *Ensayo de Mucílagos*

Los mucilagos son polisacáridos, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que eleva la densidad del agua donde se extrae. Para este ensayo se enfrió una muestra del extracto en agua de 0-5 °C.

Resultado positivo: solución toma una consistencia gelatinosa, si el ensayo es positivo.

2.5.4.14 *Ensayo de Principios amargos y astringentes*

Este ensayo se realizó saboreando 1 gota del extracto acuoso determinando la presencia de estos compuestos (Miranda, 2006i).

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

Procedimiento: Se colocó 80 g de droga cruda de *Piper peltatum* L. en un frasco ámbar, luego se colocó 400 mL de solución de etanol al 70% como solvente y se dejó reposar por 48 horas. Posteriormente al macerado, se lo colocó en el sonicador por 2 horas. Después, el extracto obtenido se filtró al vacío, después se procedió a concentrar el extracto en el rotavapor a 60 °C quedando una solución libre de alcohol y el extracto concentrado se filtró. Por último, el extracto filtrado, se congeló y liofilizó por un determinado tiempo hasta quedar libre de agua.

2.5.6 Determinación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Para la determinación de fenoles se utilizó el a técnica de Folin-Ciocalteu, basada en una reacción colorimétrica de óxido-reducción en el que la sustancia oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. Inicialmente, se procedió a la preparación de una solución estándar de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm ($\mu\text{g/mL}$), obteniendo una curva de calibración necesaria en la cuantificación de fenoles totales del extracto utilizado.

Procedimiento:

Se tomó 250 μL de solución estándar o extracto en etanol al 70% colocándolo en un balón de aforo de 25 mL, además se añadió 15 mL de agua destilada y 1,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu; la mezcla se homogenizó y se dejó en reposo por 8 min. Luego se adicionaron 3.75 mL de carbonato de sodio al 7.5% y se aforó con el agua destilada, se homogenizó y esperó durante 12 horas. Por último, se midió la absorbancia de las diferentes soluciones preparadas a 765 nm (García et al. 2010). Este procedimiento se realizó para los extractos como para las soluciones estándar.

2.5.7 Determinación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales se utilizó cloruro de aluminio y se midió por medio de espectrofotometría. Preliminarmente se prepararon soluciones estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm para la elaboración de una curva de calibración.

Procedimiento:

Se colocó 1 mL de las soluciones patrones o las muestras en alcohol al 70% en un tubo de ensayo, y se le añadió 4 mL de agua destilada y 300 µL de NaNO₂ al 5%. Posteriormente luego de 5 minutos se adicionó 300 µL de AlCl₃ al 10%. Después de 6 minutos se adicionó 2 mL de NaOH 1M. Finalmente se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos en la oscuridad. Por último, se midió la absorbancia de las diferentes soluciones preparadas a 510 nm (Boukhris et al. 2012, pp. 1206-1213). Este procedimiento se utilizó para los extractos como para las soluciones estándar.

2.5.8 *Actividad Antioxidante in vitro*

Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó el reactivo DPPH. Este ensayo se basa en una reacción redox entre la molécula DPPH* y un átomo de hidrógeno proveniente del antioxidante que es aceptado por el DPPH*, lo que provoca la reducción del DPPH* a DPPH₂, dando un cambio de coloración de púrpura a amarillo y la disminución de la absorbancia a 515 nm; medido por medio de espectrofotometría. Inicialmente, se preparó una solución patrón de ácido gálico a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm para la elaboración de una curva de calibración.

Procedimiento:

Se preparó una solución de 250 mL del reactivo DPPH, colocando 5.9 mg de DPPH en el solvente metanol, posteriormente se dejó reposar hasta que el reactivo se estabilice. En tubo de ensayo se colocó 3.9 mL de solución del reactivo de DPPH y se añadió 100 µL de solución patrón de ácido gálico o de la solución de la muestra en etanol, se mezcló y se dejó reposar en la oscuridad por 1 hora. Luego de la hora transcurrida, se midió la absorbancia a 515 nm (Brand et al. 1995, pp. 25-30). La inhibición de los radicales libres DPPH* en porcentaje (% I) se calculó de la siguiente manera:

$$\% I = \frac{A \text{ control} - A \text{ muestra}}{A \text{ control}}$$

Donde:

% I = porcentaje de inhibición

A control= la absorbancia de la reacción control

A muestra= absorbancia del extracto de ensayo.

2.5.9 Aislamiento de neutrófilos de sangre humana

En el aislamiento de neutrófilos, se realizó la extracción de 10mL sangre venosa de un paciente sano en un tubo de tapa rosca, inmediatamente se añadió 1 mL de heparina sódica para evitar la coagulación sanguínea y se adicionó MHS en relación 1:1 a la cantidad de sangre extraída. Posteriormente, se ubicó en cuatro tubos 3mL de Ficoll Paque y lentamente se colocó la sangre tratada con MHS en proporción 4:3. Después, se centrifugó los cuatro tubos durante 30 minutos a 1500 rpm. Inmediatamente, se separó los neutrófilos de los tubos separados y se mezcló con de MHS en proporción 2:1 para centrifugar a 20 minutos a 1500 rpm. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se colocó una solución hipotónica de cloruro de amonio para centrifugar nuevamente. Por último, los neutrófilos son lavados con 1 mL MHS y resuspendidos a una concentración de 10^7 células/mL, y se mantuvieron en incubación a 37 °C hasta su posterior utilización (Berridge & Tan, 1998c, pp. 74-82) (Tan & Berridge, 2000c, p. 59-68).

2.5.10 Ensayo de citotoxicidad *in vitro* con neutrófilos aislados

Previamente, se elaboró una solución diluyente de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS. Después, se preparó la solución de Tritón X-100 al 0.1% en MHS y la solución madre de extracto hidroalcohólico liofilizado se preparó con 1 mg de extracto en 5 ml de solución diluyente DMSO al 5%, y de la solución madre se realizó las respectivas diluciones a 12.5, 25, 50, 100, 200 ppm ($\mu\text{g/mL}$) (Berridge et al. 2005a, pp.127-152).

La citotoxicidad *in vitro* se determinó mezclando en un pocillo 100 μL de las diluciones a 12.5, 25, 50, 100, 200 ppm ($\mu\text{g/mL}$) del extracto o soluciones de los controles, 140 μL de una suspensión de neutrófilos a aislados en MHS y 10 μL reactivo WST-1. La preparación de los tratamientos se detalla a continuación:

Tabla 4-2: Protocolo para la realización del ensayo de citotoxicidad *in vitro* de *Piper peltatum* L.

	Tratamientos	Soluciones de los Controles/extractos	Neutrófilos aislados	Reactivo WST-1
Controles del método	Control Positivo: solución de DMSO al 5%	100 µL	140 µL	10 µL
	Control Negativo: solución de Tritón X-100 al 0.1%	100 µL	140 µL	10 µL
Diluciones de la solución madre del extracto	200 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	100 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	50 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	25 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	12.5 ppm	100 µL	140 µL	10 µL

Fuente: (Berridge et al. 2005b, pp. 127-152)

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

En cada tratamiento se colocó respectivamente las sustancias señaladas en la Tabla 4-2, y se realizaron por triplicado. Posteriormente todos los tratamientos fueron incubados en una estufa a 37 °C durante 3 horas, y finalmente, se leyó su absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm (Berridge et al. 1996a, pp. 14-19)(Ishiyama et al. 1996b, pp. 1548-1520). Para calcular el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia de sustancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del DMSO al 5\%}} \times 100$$

2.5.11 Ensayo antiinflamatorio *in vitro* con neutrófilos aislados

La actividad antiinflamatoria *in vitro* tanto del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum*, se realizó siguiendo el protocolo modificado basado en el método de Tan y Berridge (Tan & Berridge, 2000d, p. 59-68).

Inicialmente, se elaboró una solución diluyente de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS como disolvente para las diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum* L. Además, se preparó la solución de Tritón X-100 al 0.1% en MHS y la solución de Ácido acetilsalicílico a 200 ppm (mg/L) en solución diluyente. La solución madre de extracto hidroalcohólico liofilizado, se preparó con 1 mg de extracto en 5 ml de solución diluyente DMSO al 5%, de la solución madre se realizó las respectivas diluciones a 12.5, 25, 50, 100, 200 ppm (µg/mL).

La actividad antiinflamatoria *in vitro* se determinó mezclando en un pocillo 100 µL de las diluciones a 12.5, 25, 50, 100, 200 ppm (µg/mL) del extracto o soluciones de los controles, 140 µL de una suspensión de neutrófilos a aislados en MHS y 10 µL reactivo WST-1. La preparación de los tratamientos se detalla a continuación:

Tabla 5-2: Protocolo del ensayo de actividad antiinflamatoria *in vitro* de *Piper peltatum* L.

	Tratamientos	Soluciones de los Controles/ extractos	Neutrófilos aislados	Reactivo WST-1
Controles del método	Control Positivo: solución DMSO al 5%	100 µL	140 µL	10 mL
	Control Negativo: solución Tritón X-100 al 0.1%	100 µL	140 µL	10 mL
	Control Comparativo: solución de Ácido acetilsalicílico a 200 ppm	100 µL	140 µL	10 mL
Diluciones de la solución madre del extracto	200 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	100 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	50 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	25 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	12.5 ppm	100 µL	140 µL	10 µL

Fuente: (Tan & Berridge, 2000e, pp. 59-68)

Realizado por: Jahaira Bermúdez

En cada tratamiento se colocó respectivamente las sustancias señaladas en la Tabla 5-2, y se realizaron por triplicado. Posteriormente, todos los tratamientos fueron incubados en una estufa a 37 °C durante una media hora.

Después de la incubación, se añadió a cada tratamiento 50 µL de una solución de Zymosan opsonizado para iniciar la reacción. Los pocillos con los tratamientos fueron nuevamente incubados a 37°C, durante una hora. Finalmente, se leyó su absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm. Para calcular el porcentaje de inhibición inflamatoria con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhi. Inflamatoria} = \frac{\text{Absorbancia del DMSO al 5\%} - \text{Absorbancia de sustancia ensayada}}{\text{Absorbancia del DMSO al 5\%}} \times 100$$

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Ensayos de Control de calidad de Droga Cruda

Los ensayos del control de calidad de la droga cruda de hojas de *Piper peltatum*, se realizaron por triplicado y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 1-3: Resultados obtenidos del Control de Calidad de la droga cruda (hojas de *Piper peltatum*)

Parámetro	Media de los Resultados obtenidos	Referencia de la USP # 35
Humedad	5.53% ± 0.09	≤ 10%
Cenizas Totales	10.13% ± 0.15	≤ 12%
Cenizas solubles en H₂O	6.44% ± 0.07	≤ 7%
Cenizas insolubles en HCl	3.57% ± 0.18	≤ 5%

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Como se observa en la Tabla 1-3, en la determinación del contenido de Humedad de la droga cruda, las hojas de *Piper peltatum*, obtuvieron un resultado de 5.53%, encontrándose dentro de los parámetros establecidos por la USP 35 que especifica que sea menor al 10%. Este ensayo es esencial para establecer la conservación de la droga vegetal porque determina el contenido de agua. El exceso de agua puede provocar un crecimiento microbiano, y además puede inducir la hidrólisis de diferentes metabolitos.

En la determinación de cenizas totales se puede observar que la droga vegetal presenta un 10.13%, encontrándose dentro del 12% que establece la USP 35. Este ensayo permite conocer el contenido de sales minerales que presenta la planta o de materia extraña que se adhirió a al material vegetal utilizado, verificando la calidad de la droga vegetal analizada.

Los resultados de cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico de la droga cruda se encuentran dentro de los rangos establecidos por la USP 35, con un 6.44% y 3.57% respectivamente como se observa en la Tabla 1-3. La determinación de cenizas insolubles en ácido permite determinar si la droga cruda contiene sustancias minerales como la arena. En cambio, el ensayo de cenizas solubles en agua permite conocer el contenido de sales solubles. Ante los resultados mencionados, se puede garantizar la calidad de la droga vegetal utilizada en posteriores ensayos.

3.2 Tamizaje Fitoquímico

En la identificación cualitativa de los grupos fitoquímicos, se realizó la extracción de metabolitos de las hojas de *Piper peltatum* con diferentes solventes (éter etílico, etanol y agua) que penetran el material vegetal, permitiendo determinar la presencia de componentes hidrófilos como lipófilos. Consecuentemente, cada solvente puede extraer metabolitos de diferente polaridad en dependencia del solvente utilizado. En la siguiente tabla 2-3, se puede observar los resultados obtenidos del Tamizaje Fitoquímico de los extractos de hojas de *Piper peltatum* L.

Tabla 2-3: Resultados obtenidos del Tamizaje Fitoquímico de los extracto etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de *Piper peltatum* L.

Determinación de metabolitos	Indicadores	Tipo de extracto		
		ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
SUDAN (Aceites - grasas)	Coloración roja (+)	(+)		
BALJET (Lactonas - cumarinas)	Rojo (++) Precipitado rojo (+++)	(-)	(-)	
DRAGENDORFF (Alcaloides)	Opalescencia (+)	(+)	(+)	(+)
WAGNER (Alcaloides)	Turbidez definida (++) Precipitado (+++)	(+)	(+)	(+)
MAYER (Alcaloides)		(+)	(+)	(+)
LIEBERMANN BURCHARD (Triterpenos- esteroides)	Rosado-azul Verde intenso Verde oscuro negro (+)	(+)	(+)	
CATEQUINAS	Mancha verde carmelita (+)		(-)	
RESINAS	Precipitado (+)		(+)	
FEHLING (Azucars reductores)	Rojo Precipitado rojo (+)		(+)	(+)
CLORURO FÉRRICO (Fenoles -taninos)	Rojo vino Verde intenso		(+)	(+)

	Azul (+) Marrón presencia de ácidos alifáticos			
ESPUMA (Saponinas)	Presencia de espuma por más de 2 minutos.		(-)	(+)
BORTRAGER (Quinonas)	Rosado (++) Rojo (+++)		(+)	
SHINODA (Flavonoides)	Amarillo - Naranja Carmelita o Rojo (+)		(+)	(+)
ANTOCIANIDINAS (Secuencias de grupos de flavonoides)	Rojo (++) Marrón (+++)		(-)	
MUCÍLAGOS	Consistencia gelatinosa (+)			(+)
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES				(-)

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Como se observa en la tabla anterior, el análisis fitoquímico realizado en el extracto etéreo, se identificó la presencia de compuestos grasos, alcaloides y compuestos esteroidales. En el caso de los pruebas fitoquímicas realizadas en el extracto etanólico dieron positivo a diferentes compuestos como alcaloides, compuestos esteroidales y triterpenoides, resinas, azúcares reductores, taninos, quinonas y flavonoides; siendo el extracto positivo en la mayoría de pruebas realizadas. Por último en el extracto acuoso se identificó la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, mucílagos, fenoles y taninos.

En los ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer en el extracto etéreo, alcohólico y acuoso se observó opalescencia siendo positivo para alcaloides. En cambio en el ensayo de Cloruro férrico del extracto acuoso se dio una coloración marrón que indica la presencia de otro grupo funcional en el extracto como los ácidos alifáticos, esto lo señala Pasto y Johnson (Pasto & Johnson, 1981). Los ácidos alifáticos son derivados de ácidos benzoicos que fueron identificados en otros estudios como componentes de la especie analizada (Soto, 2015e, pp. 105-116).

Los metabolitos identificados en este estudio coinciden con lo reportado por Soto en el estudio fitoquímico de la especie *Piper peltatum*. Además, se evidenció abundante presencia de flavonoides, fenoles y taninos en este estudio (Soto, 2015f, pp. 105-116). En otro estudio fitoquímico de varias especies vegetales realizado por Beltrán, Díaz & Gómez, se reporta que los ensayos resultaron positivos para todos los fitoconstituyentes analizados y también se identificó la presencia de otros metabolitos como glicósidos cardiotónicos (Beltrán et al. 2014, pp. 619-631). Los metabolitos identificados en la especie *Piper peltatum* L. son los responsables de sus diversas aplicaciones etnobotánicas como diurético, antipirético, agente antiinflamatorio, antimalárico, hepatoprotector, entre otros (Puertas et al. 2009e).

3.3 Control de calidad del extracto alcohólico

En este control, se utilizó el extracto alcohólico de la droga vegetal de las hojas de *Piper peltatum* y se realizaron diferentes ensayos físicos-químicos que determinan la calidad de este. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente Tabla 3-3:

Tabla 3-3: Resultados obtenidos en el Control de calidad del extracto alcohólico

Parámetros	Resultados
Características Organolépticas	Aspecto: líquido pegajoso
	Determinación del color: verde oscuro
	Determinación del olor: característico, aromático
	Determinación del sabor: amargo
Densidad Relativa	0.8293 g/mL
Índice de Refracción	1.363
Determinación de pH	6.03
Determinación de Sólidos Totales	1.14%

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

En la tabla anterior se observan los resultados obtenidos en el control calidad del extracto alcohólico de hojas de *Piper peltatum*. Con respecto a las características organolépticas estudiadas, se determinó que el extracto es de consistencia líquida pegajosa de color verde, con un olor aromático y de sabor amargo. Estas características se debe a la diversidad metabolitos extraídos en el extracto propias de la especie ensayada (Hermosilla Espinosa et al. 2013a, pp. 361-367).

En la determinación de pH del extracto alcohólico de hojas de *Piper peltatum*, se obtuvo un resultado de 6.03, especificando que el extracto es ligeramente ácido y puede contener compuestos químicos con características ácidas débiles, tales como: flavonoides, taninos, saponinas, quinonas, entre otros (Pacheco et al. 2006, pp. 78-83).

Otro parámetro analizado fue el índice de refracción que indico un resultado de 1.363, mayor en comparación con el índice de refracción del agua, demostrando que existen sustancias disueltas en el extracto.

En el parámetro de densidad relativa del extracto se obtuvo como resultado de 0.8293 g/mL, siendo mayor en comparación con la densidad del etanol de 0.805 - 0.812 g/mL, exponiendo que las sustancias que se encuentran disueltas en el extracto provocan que la muestra sea más densa.

Por último, el resultado del porcentaje de sólidos totales de la muestra analizada fue de 1.14%, mostrando que el extracto contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios extraídos por el solvente empleado (Hermosilla Espinosa et al. 2013b, pp. 361-367).

3.4 Determinación de Fenoles Totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

En el método de Folin-Ciocalteu fue utilizado el ácido gálico como estándar de referencia, necesario para la elaboración de una curva de calibración, que presentó la siguiente ecuación de la recta: $y = 0.0026x + 0.0286$ y con un valor de $R^2 = 0.9991$. Para obtener el resultado de los fenoles totales, se interpoló el valor obtenido de la absorbancia de la muestra con la curva de calibración del ácido gálico. En la Tabla 4-3, se muestran los resultados obtenidos expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de planta.

Tabla 4-3: Resultados de la determinación de Fenoles Totales

Extracto Liofilizado de <i>Piper peltatum</i>	Fenoles totales expresados como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto liofilizado
1250 ppm (0.0125 g) en etanol al 70%	2443.01 ± 76.92

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

En la tabla anterior se observa que el extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum*, el cual contiene 2443.01 mg de GAE/g de extracto, representando la cantidad de Fenoles. En comparación con otro estudio se evidenció que el extracto hexánico crudo de esta especie contiene 8.6 ± 0.9 expresados en miliequivalentes de ácido gálico (mEqAG) en 100g de planta (Puertas et al. 2009f). Los resultados difieren entre sí, debido a que los estudios se efectuaron en diferentes condiciones como la utilización de diferentes solventes en la extracción de la droga vegetal para determinar el contenido de fenoles totales en esta especie.

3.5 Determinación de Flavonoides Totales

El método colorimétrico de tricloruro férrico fue utilizado para la determinación de Flavonoides Totales, en este ensayo se utilizó como patrón de referencia la quercetina, necesaria para la elaboración de una curva de calibración. La ecuación de la recta obtenida de las diferentes concentraciones de quercetina fue de: $y = 0.0012 x + 0.0256$, esencial para obtener el resultado de los fenoles totales en las hojas de la especie *Piper peltatum*, seguidamente se interpoló el valor obtenido de la absorbancia de la muestra con la curva de calibración obtenida. En la Tabla 5-3, se muestran los resultados exhibidos en mg equivalentes de quercetina por g de extracto de la planta.

Tabla 5-3: Resultados de la Determinación de Flavonoides

Extracto Liofilizado de <i>Piper peltatum</i>	Flavonoides expresados como mg equivalentes de quercetina/g de extracto liofilizado
1000 ppm (0.01g) en etanol al 70%	559.85 ± 12.65

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

En la tabla anterior se observa que el extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum* contiene 559.85 mg QE/g de extracto, representando la cantidad de Flavonoides. En otro estudio, se reporta la cuantificación de flavonoides totales de *P.peltatum*, utilizando el método propuesto de Kostenni- Kova, el cual indicó la presencia de 1.8 ± 0.16 g equivalentes de quercetina por cada 100 g de hoja seca.

La cantidad de flavonoides que se han registrado en esta planta son muy variables entre sí, debido a que los individuos de una misma especie pueden pasar por diversos factores (climáticos, atmosféricos, topográficos y edáficos) que provocan un aumento o disminución de sus metabolitos (Puertas et al. 2009g).

3.6 Actividad Antioxidante *in vitro*

La actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* se evaluó por el método DPPH*. Para obtener la concentración inhibitoria media (IC₅₀) del extracto de la planta, se midió el porcentaje de captación de radicales libres a diferentes concentraciones del extracto como se observa en la Tabla 6-3 y en el Gráfico 1-3.

Tabla 6-3: Actividad Antioxidante del extracto hidralcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum*

Concentración del extracto	% de Captación de Radicales libres
10 ppm	3.21
50 ppm	4.17
100 ppm	4.65
200 ppm	5.45
500 ppm	9.46
1000 ppm	15.71
1500 ppm	19.67
2000 ppm	29.84
5000 ppm	65.74
7500 ppm	77.38
10000 ppm	81.64

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

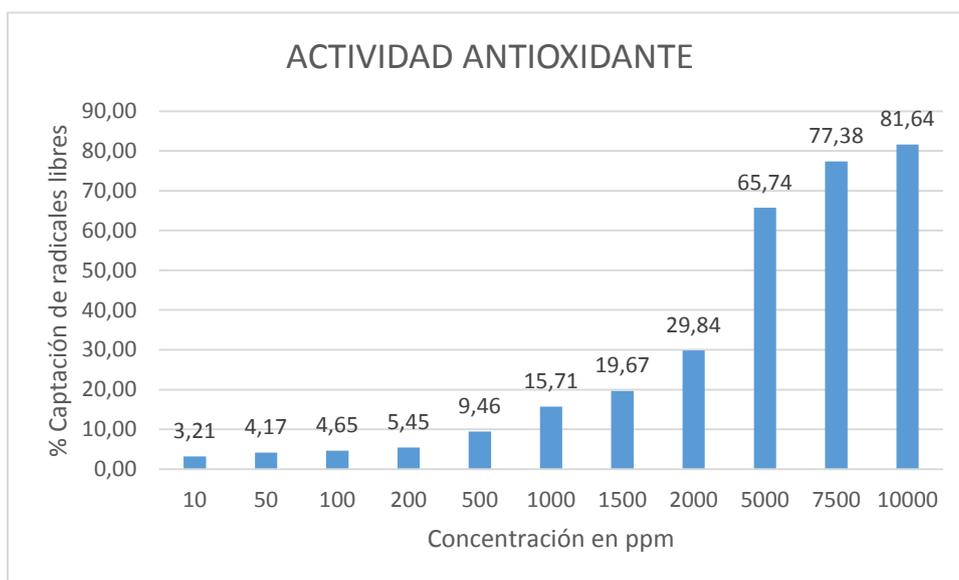


Gráfico 1-3: Porcentaje de Captación de radicales a diferentes concentraciones del extracto hidralcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum*.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

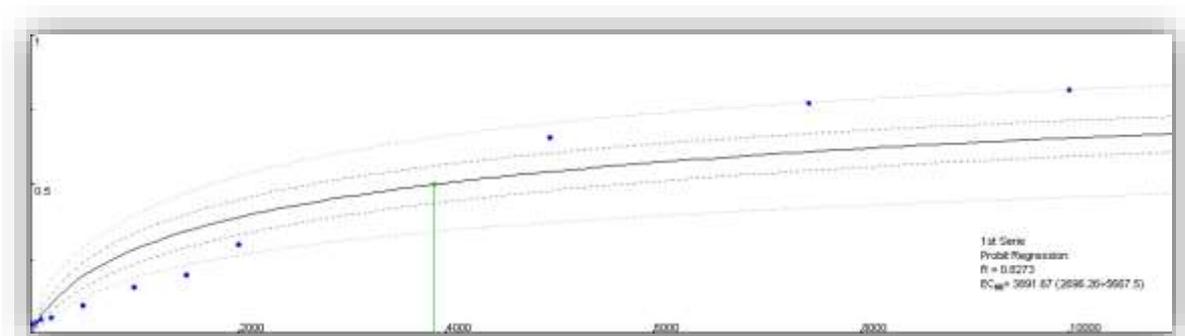


Gráfico 2-3: Curva de la concentración inhibitoria media del extracto del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum* en la actividad antioxidante.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

En el Gráfico 2-3, se observa que el IC_{50} (concentración que el extracto necesita para inhibir al 50% la actividad oxidante) del extracto hidroalcohólico de *Piper peltatum* fue de 3891.67 $\mu\text{g/mL}$.

En contraste con otro estudio, se determinó la actividad antioxidante del extracto hexánico crudo de hojas de *Piper peltatum* mediante el método DPPH, obteniendo como resultado un $IC_{50} = >200$ mg de extracto/ μmol de DPPH. La principal diferencia entre ambos resultados se debe a las diversas condiciones en que se efectuaron ambos estudios, entre ellos la diferencia en la polaridad del solvente fluctuando en la extracción de metabolitos. (Puertas et al. 2009h).

3.7 Actividad Citotóxica *in vitro*

Este ensayo, se basó en el método colorimétrico modificado de Tan y Berridge, fundamentado en la detección de las células viables con el fin de obtener el porcentaje de viabilidad celular evaluado mediante el efecto de diferentes concentraciones del extracto. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 7-3: Resultados de la actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum*.

Concentración del extracto	% de Viabilidad Celular
200 ppm	51.22 ± 0.56
100 ppm	60.60 ± 0.57
50 ppm	68.39 ± 0.57
25 ppm	74.95 ± 1.41
12.5 ppm	78.61 ± 1.15

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

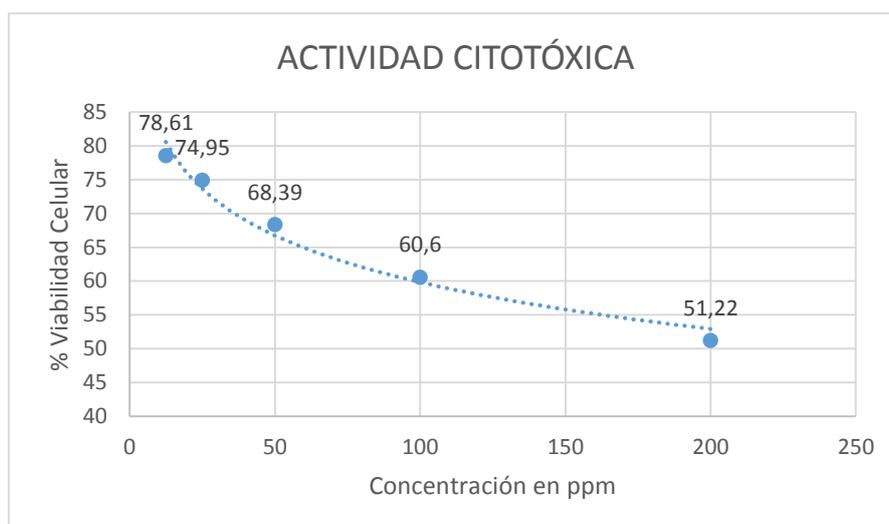


Gráfico 3-3: Porcentaje de la viabilidad celular obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum*.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

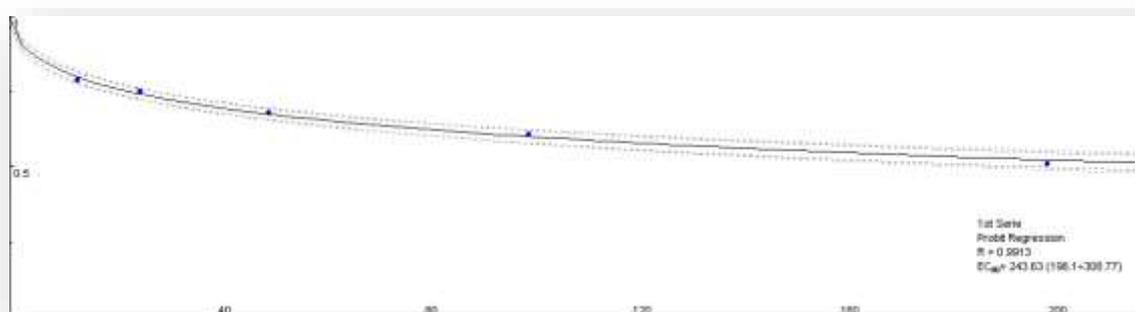


Gráfico 4-3: Curva de la concentración letal media del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum* en la actividad citotóxica.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

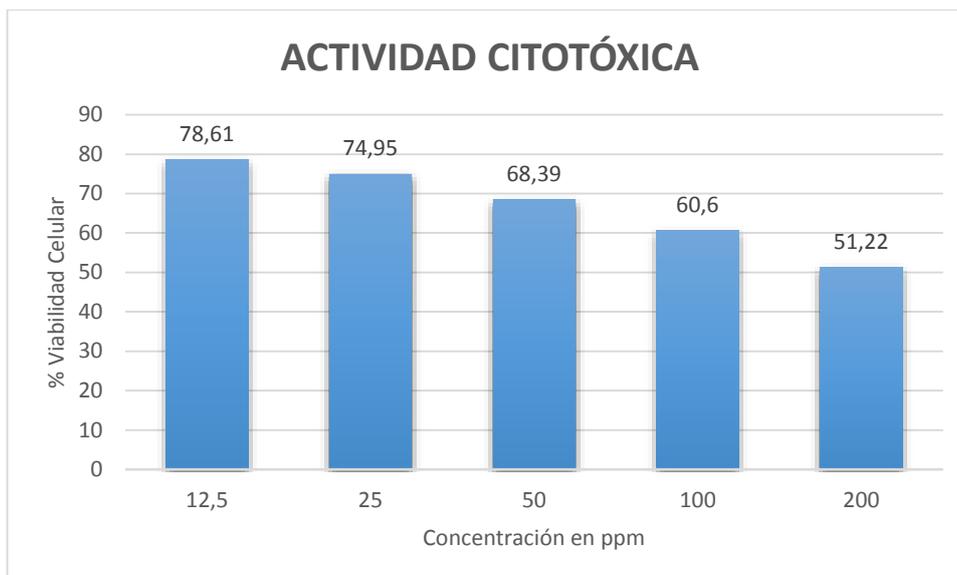


Gráfico 5-3: Representación gráfica de la actividad citotóxica expresada en porcentaje de viabilidad celular obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum*.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Los datos obtenidos de la actividad citotóxica, fueron analizados estadísticamente por medio de un Diseño Completamente Aleatorio con el test ANOVA de un factor, mediante el programa estadístico SPSS 23, con el fin de establecer si existen diferencias significativas entre los datos obtenidos del porcentaje de viabilidad celular por efecto de las concentraciones de extracto de la planta.

Inicialmente, se analizó que los datos cumplan con los dos supuestos fundamentales para la estadística paramétrica como la distribución normal y la homogeneidad de varianzas. Ante lo mencionado, se aplicó el test de Kolmogorov Smirnov y la Prueba de Levene. En el test de Kolmogorov Smirnov, se obtuvo un nivel de significación mayor a 0.05 como se exhibe en el Gráfico 1A; demostrando que no existe diferencias entre la distribución normal y la viabilidad celular, debido a que la variable dependiente se distribuye normalmente entre poblaciones muestreadas cumpliendo con el primer supuesto. En la prueba de Levene, como se observa en el Gráfico 2A, se obtuvo un nivel de significación de $p > 0.05$, demostrando que las muestras en el estudio poseen la misma varianza; al cumplirse los dos supuestos se puede analizar los datos mediante estadísticas paramétricas.

Después, se analizaron los datos con el test ANOVA de un factor que exhibió un nivel de significancia igual a cero, especificando que existe diferencias entre el porcentaje de viabilidad celular por efecto de las concentraciones del extracto utilizadas, consecuentemente se rechaza la hipótesis nula (H_0); como se observa en el Gráfico 3A. Posteriormente mediante el Test de Tukey,

se comprobó que todos los tratamientos estudiados son diferentes entre sí; indicando que el porcentaje de viabilidad celular obtenida a una determinada concentración, no es igual al porcentaje de viabilidad celular entre las otras concentraciones, como se observa en el Gráfico 4A.

También, se evidenció que el extracto a 200 ppm posee menor porcentaje de viabilidad celular con un 51.22%, frente a la de 12.5 ppm que obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad celular con un 78.61%. Estos resultados demuestran estadísticamente que el resultado del % viabilidad celular fue significativamente diferente por efecto de las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 ppm como se observa en el Gráfico 5-3. Este resultado demuestra que el extracto tiene una actividad citotóxica baja en neutrófilos aislados. (Berridge et al. 1996b, pp. 14-19).

En el Gráfico 4-3, se observa la Curva de la concentración letal media del extracto en la actividad citotóxica, con un $LC_{50} = 243.63 \mu\text{g/mL}$; determinando cuantitativamente la concentración que el extracto requiere para reducir al 50% la viabilidad celular en el ensayo.

En otro estudio de la actividad citotóxica *in vitro* a partir de líneas celulares tumorales, se analizaron una variedad de extractos de diferentes partes de *P. peltatum*, y el extracto etanólico de la raíz obtenido por repartición líquido-líquido, el cual presentó la mayor inhibición de las líneas celulares tumorales ensayadas (Pinto et al. 2006c, p. 205-211).

3.8 Actividad Anti-inflamatoria *in vitro*

La evaluación de la actividad anti-inflamatoria *in vitro*, se realizó mediante el método colorimétrico modificado de Tan y Berridge que mide por espectrofotometría la reducción de las sales de tetrazolio (WST-1), en presencia de neutrófilos aislados activos. Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de inhibición inflamatoria y los resultados se indican a continuación:

Tabla 8-3: Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum*.

CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS	% INHIBICIÓN INFLAMATORIA
Ácido Acetil salicílico 200 ppm	73.13 ± 0.35
Extracto 200 ppm	67.56 ± 0.46
Extracto 100 ppm	59.92 ± 0.46
Extracto 50 ppm	53.13 ± 0.46
Extracto 25 ppm	48.47 ± 0.32
Extracto 12,5 ppm	45.29 ± 0.69

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

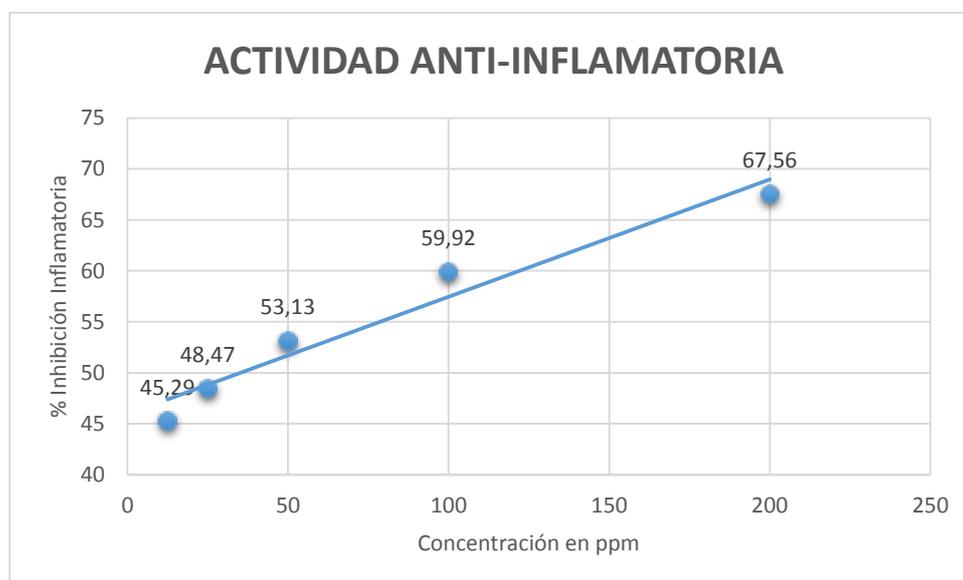


Gráfico 6-3: Porcentaje de la Inhibición Inflamatoria obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de la planta.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

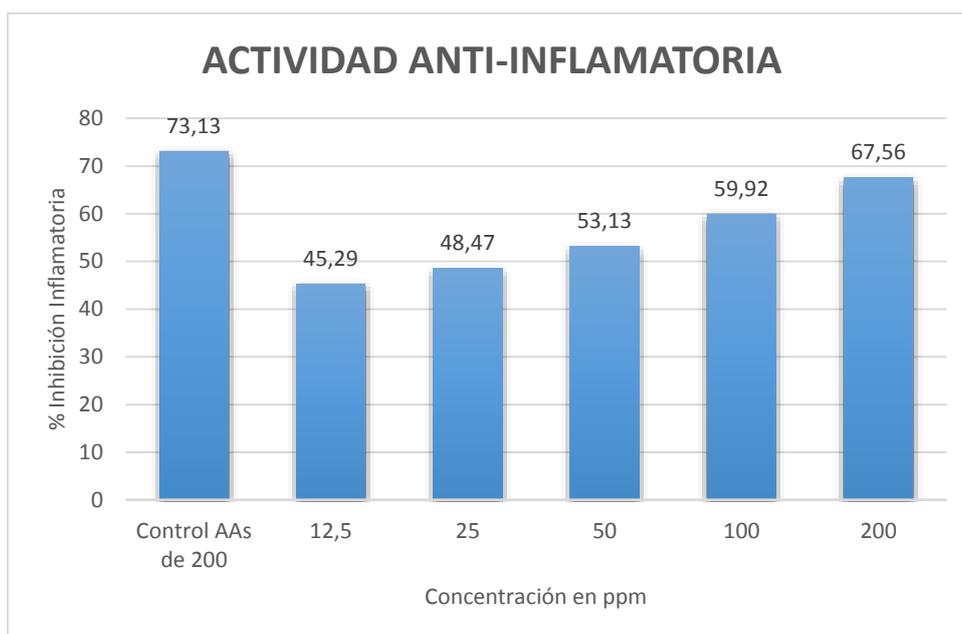


Gráfico 7-3: Representación gráfica de la Actividad Anti-inflamatoria expresada en porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida por efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum*.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

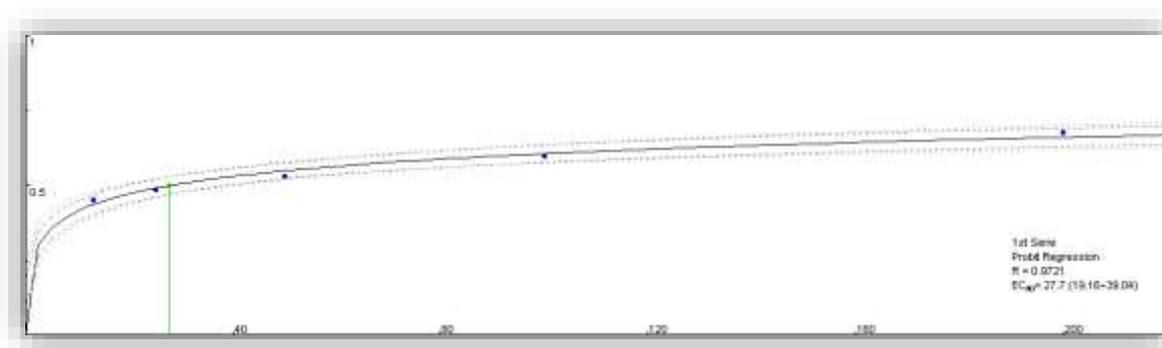


Gráfico 8-3: Curva de la concentración inhibitoria media del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum* en la actividad anti-inflamatoria.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el test de ANOVA de un factor con el programa estadístico SPSS 23, para establecer si existen diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición inflamatoria con las concentraciones de extracto de la planta utilizada y la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico).

Inicialmente, se verificó que los datos cumplan con los dos supuestos fundamentales para la estadística paramétrica como la distribución normal y la homogeneidad de varianzas; aplicando el Test de Kolmogorov Smirnov y la Prueba de Levene, respectivamente. En el análisis ejecutado con test de Kolmogorov Smirnov, se obtuvo un nivel de significación de $p > 0.05$ como se observa en el

Gráfico 1B; demostrando que no existe diferencias entre la distribución normal y la inhibición inflamatoria. Por lo tanto, la variable dependiente se distribuye normalmente entre las muestras cumpliendo con el primer supuesto. En la prueba de Levene como se observa en el Gráfico 2B, presentó un nivel de significación de $p > 0.05$; indicando que los tratamientos en este estudio tienen una varianza equivalente. Al cumplirse los dos supuestos se aconseja utilizar estadísticas paramétricas en este análisis.

Posteriormente, se examinaron los datos obtenidos con el test ANOVA de un factor, determinando que existe diferencias significativas en el % de Inhibición Inflamatoria por efecto de las concentraciones del extracto utilizadas, dado que el nivel de significancia fue cero; consecuentemente, se rechazó la hipótesis nula (H_0) como se observa en el Gráfico 3B. Seguidamente, se analizaron los datos con el Test de Tukey como se observa en el Gráfico 4B, comprobando que todos los tratamientos son diferentes entre sí. Por lo tanto, se entiende que el porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida a una específica concentración, no es igual al porcentaje de inhibición inflamatoria obtenida a otras concentraciones y la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico).

Además, se determinó que entre las concentraciones analizadas la sustancia de referencia (Ácido Acetilsalicílico) a 200 ppm presentó el mayor porcentaje de inhibición inflamatoria con un 73.13%, consecutivamente la concentración del extracto a 200 ppm presentó un porcentaje de 67.56%. La concentración del extracto a 200 ppm presentó el mayor % de inhibición inflamatoria demostrando estadísticamente que el porcentaje de inhibición inflamatoria fue significativamente diferente entre las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5 ppm.

En este estudio, se exhibió que la concentración a 200 ppm presenta una actividad antiinflamatoria significativa *in vitro* como se observa en la Tabla 8-3, que provocó la reducción de sales de tetrazolio a compuestos de formazan en neutrófilos aislados activados demostrando la inhibición de la inflamación. Además, en el Gráfico 8-3, se observa la Curva con un $IC_{50} = 27.7 \mu\text{g/mL}$, determinando cuantitativamente la concentración que el extracto requiere para inhibir al 50% la inflamación en los neutrófilos aislados.

En otro estudio realizado en animales de experimentación (Ratas Wistar), se determinó que el extracto metanólico de hojas de *Piper peltatum* administrado por vía oral a una dosis de 20 mg/kg, presentó una actividad antiinflamatoria *in vivo* significativa reduciendo la respuesta edematosa

inducida por carragenina con un efecto comparable con el control fenilbutazona (Desmarchelier et al. 2000, pp. 556-558).

La especie *Piper peltatum* contiene una diversidad de metabolitos secundarios en su composición química que pueden ser los promotores de la actividad farmacológica como el alcaloide piperina reconocida por sus diversas actividades farmacológicas como antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorio (Delgado et al. 2013b, pp. 269-282) (Mujumbar et al. 1990, pp. 95-100).

También, presenta una cantidad considerable de fenoles y flavonoides que presentan diferentes aplicaciones etnobotánicas como la anti-inflamatoria. Otros componentes que presenta esta especie vegetal son las saponinas y taninos conocidos por presentar una actividad anti-inflamatoria considerable (Mohammed & Osman, 2014, pp. 275-285). En otros estudios, se aisló el componente natural 4- Nerolidilcatecol con un alto potencial farmacológico que evidenció actividad anti-inflamatoria, antioxidante entre otras propiedades (Silva et al. 2013, p. 178-189).

CONCLUSIONES

- Mediante ensayos de control de calidad de la droga cruda y del extracto alcohólico de hojas de *Piper peltatum*, se demostró que la muestra utilizada cumple con los rangos establecidos en la USP 35; garantizando la calidad de la droga vegetal para los posteriores ensayos.
- Se realizó la identificación cualitativa de los grupos fitoquímicos representativos de esta planta mediante una extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente; determinando la presencia de una diversidad de metabolitos como aceites o grasas, resinas, azúcares reductores, fenoles, flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas, mucílagos y estructuras esteroidales.
- Se determinó que el extracto de hojas de *Piper peltatum* contiene una considerable cantidad de fenoles, alcanzando un valor de 2443.01 mg GAE/g de extracto. Además, se evidenció que el extracto contiene una cantidad moderada de flavonoides totales de 559.85 mg QE/g de extracto.
- Se demostró que el extracto de hojas de *Piper peltatum* presenta una capacidad captadora de radicales libres no significativa con un IC₅₀ de 3891.67 µg/mL.
- Se determinó la actividad citotóxica *in vitro* del extracto de hojas de *Piper peltatum*, obteniéndose una actividad citotóxica baja a 200 ppm con un porcentaje de viabilidad celular de 51.22 ± 0.56% y un LC₅₀ = 243.63 µg/mL.
- Se demostró estadísticamente que el extracto de hojas de *Piper peltatum*, presenta una actividad antiinflamatoria moderada a 200 ppm con un porcentaje de inhibición inflamatoria del 67.56 ± 0.46%; aunque inferior en contraste con la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico) a 200 ppm con un 73.13 ± 0.35% y un IC₅₀ = 27.7 µg/mL.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio comparativo de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* de extractos de hojas de *Piper peltatum* obtenidos con solventes de diferentes polaridades, para determinar el tipo de extracto con mayor actividad.
- Se recomienda realizar un estudio de la actividad anti-inflamatoria y citotóxica *in vitro* como *in vivo* de extractos de raíces de *Piper peltatum* debido a los antecedentes que presenta esta planta.
- Se recomienda evaluar la actividad diurética *in vivo* de esta planta por los antecedentes etnofarmacológicos encontrados en bibliografía.

BIBLIOGRAFÍA

Amorim, C.Z. et al. Screening for Antimalarial Activity in the Genus *Pothomorphe*. A: *Journal of Ethnopharmacology*. 1988, Vol. 24, p. 101-106. [Consulta: 10 abril 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/20097351_Screening_for_antimalarial_activity_in_the_Genus_Pothomorphe.

Anoopkumar, S. et al. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. A: *The British Journal of Radiology*. 2005, Vol. 78, p. 945-947. [Consulta: 25 julio 2017]. DOI 10.1259/bjr/54004230. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177019>.

Ávalos, A. & Elena, G. Metabolismo secundario de plantas. A: *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2009, Vol. 2, núm. 3, p. 119-145. [Consulta: 10 mayo 2017]. Disponible en: eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf.

Baquero, E. et al. Actividad antimicobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana. A: *Scientia et Technica* [en línea]. 2007, Vol. 1, núm. 33, p. 133-136. [Consulta: 15 abril 2017]. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6157>.

Beckman, J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. A: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, Vol. 87, núm. February, p. 1620-1624. [Consulta: 18 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154753>

Bedascarrasbure, E. et al. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos Argentino. A: *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2004, Vol. 23, núm. 3, p. 369-372. [Consulta: 11 mayo 2017]. ISSN 03262383. Disponible en: www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_2_2_5OA9K8V7K9.pdf

Beltrán, C., Díaz, F. & Gómez, H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. A: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2014,

Vol. 18, núm. 4, p. 619-631. [Consulta: 29 julio 2017]. Disponible en: scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013

Benavente, O. & Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. A: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, Vol. 56, núm. 15, p. 6185-6205. [Consulta: 18 mayo 2017]. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf8006568.

Berridge, M. V et al. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. A: *Biochemica*. 1996, Vol. 4, p. 14-19. [Consulta: 29 julio 2017]. Disponible en: https://shop.roche.com/.../BIOCHEMICA_96_4_p14-19.pdf

Berridge, M. V, Herst, P.M. & Tan, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology : New insights into their cellular reduction. A: *Biotechnology Annual Review*. 2005, Vol. 11, núm. 5, p. 127-152. [Consulta: 25 julio 2017]. DOI 10.1016/S1387-2656(05)11004-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216776>

Berridge, M. & Tan, A. Trans-plasma membrane electron transport : a cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular , superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. A: *Protoplasma*. 1998, Vol. 205, p. 74-82. [Consulta: 21 mayo 2017]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01279296> -

Bertha, G. & Robledo, V. Inflamación. A: *Rev. Fac. Med UNAM*. 2008, Vol. 51, núm. 5, p. 220-222. [Consulta: 07 mayo 2017] Disponible en: new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=17296

Bordes, R. et al. El proceso Inflamatorio. A: *Revista de Enfermería*. Granada: 2010, p. 9-12. [Consulta: 02 mayo 2017] Disponible en: <https://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>

Boukhris, M. et al. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential

oil of rose-scented geranium, *pelargonium graveolens*. A: *Phytotherapy Research*. 2012, Vol. 27, núm. 8, p. 1206-1213. [Consulta: 25 julio 2017]. ISSN 0951418X. DOI 10.1002/ptr.4853. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027699>

Brand, W., Cuvelier, M. & Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. A: *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 1995, Vol. 28, p. 25-30. [Consulta: 25 julio 2017]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085

Breitbach, U. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C . F . P . von Martius in the 19th century. A: *Journal of Ethnopharmacology*. 2013. [Consulta: 20 marzo 2017]. DOI 10.1016/j.jep.2013.02.030. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500885>

Chen, Z., Bertin, R. & Froidi, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. A: *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 2013, Vol. 138, p. 414-420. [Consulta: 29 agosto 2017]. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.11.001. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612016020

Cruz, L.R. et al. Malaria in South America: a drug discovery perspective. A: *Malaria journal* [en línea]. 2013, Vol. 12, núm. 1, p. 168. ISSN 1475-2875. [Consulta: 16 febrero 2017]. DOI 10.1186/1475-2875-12-168. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3665683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Delgado, G., Kato, M. & Rojas, C. Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos in vitro de *Piper* sp. A: *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*. 2013, Vol. 12, núm. 3, p. 269-282. [Consulta: 28 marzo 2017]. ISSN 07177917. Disponible en: www.redalyc.org/articulo.oa?id=85626383012

Desmarchelier, C. et al. Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios , Perú). A: *Ethno-Farmacology*. 1996, Vol. 52, p. 45-51. [Consulta: 11 marzo 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8733119>

Desmarchelier, C. et al. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II) -dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L .) Miq . A: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1997, Vol. 30, p. 85-91.

Desmarchelier, C. et al. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). A: , *Internatonal Journal of Pharmacognosy*. 1997, Vol. 35, núm. 4, p. 288-296. [Consulta: 22 abril 2017]. Disponible en:https://www.researchgate.net/publication/232052752_Total_Reactive_Antioxidant_Potential_TRAP_and_Total_Antioxidant_Reactivity_TAR_of_Medicinal_Plants_Used_in_Southwest_Amazonia_Bolivia_and_Peru.

Desmarchelier, C., Slowing, K. & Ciccía, G. Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract. A: *Fitoterapia*. 2000, Vol. 71, núm. 5, p. 556-558. ISSN 0367326X. [Consulta: 30 agosto 2017]. DOI 10.1016/S0367-326X(00)00167-2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11449506>

Díaz, L. et al. Antioxidant, Antitubercular and Cytotoxic activities of *Piper imperiale*. A: *Molecules*. 2012, Vol. 17, núm. 4, p. 4142-4157. [Consulta: 18 febrero 2017]. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules17044142. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22481537>

Díaz, S.L. Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Iserertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos [en línea]. *Pontificia Universidad Javeriana*, 2006. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis75.pdf>.

Domingos, J. et al. Volatile Constituents of Brazilian Piperaceae , Part 5 . The Oils of *Pothomorphe umbellata* and *P . peltate*. A: *J. Essent. Oil Res.* 1999, Vol. 11, p. 479-481. [Consulta: 28 marzo 2017]. DOI 10.1080/10412905.1999.9701190. Disponible en: www.tandfonline.com/doi/abs/10.../10412905.1999.9701190

Escobar, L., Rivera, A. & Aristizábal, F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas tumorales humanas. A: *Vitae*. 2010, Vol. 17, núm. 1, p. 67-74. Consulta: 25 julio 2017]. Disponible en:

www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121.

Ferreira-da-Cruz, M. et al. The Intraperitoneal *Plasmodium berghei* -Pasteur Infection of Swiss Mice Is Not a System That Is Able to Detect the Antiplasmodial Activity in the *Pothomorphe* Plant Extracts That Are Used as Antimalarials in Brazilian Endemic Areas. A: *Experimental Parasitology*. 2000, Vol. 94, p. 243-247. [Consulta: 12 abril 2017]. DOI 10.1006/expr.2000.4494. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001401390000055.

García, E., Segovia, F. & Fuentes, A. *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. 2010. Valencia: ETSIAMN,2010.

García, P. Inflamación. A: *Rev.R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 2008, Vol. 102, núm. 1, p. 91-159. [Consulta: 10 mayo 2017] Disponible en: www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf

Gómez, H.A., González, K.N. & Medina, J.D. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. A: *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2011, Vol. 10, núm. 3, p. 182-217. [Consulta: 15 febrero 2017]. ISSN 07177917. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>

Gustafson, K.R. et al. The Peltatols, Novel HIV-Inhibitory Catechol Derivatives. A: *J. Org. Chem.* 1992, Vol. 57, núm. 6, p. 2809-2811. [Consulta: 05 abril 2017]. Disponible en: pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00036a010

Hall, V., Murillo, N. & Rocha, M. *Antiinflamatorio no Esteroideos (AINE 'S)*. Costa Rica: Centro Nacional de Información de Medicamentos, 2001.

Hermosilla Espinosa, R. et al. Estudio fitoquímico y control de calidad de extractos de hojas de *Rheedia aristata* Griseb. A: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2013, Vol. 18, núm. 3, p. 361-367. [Consulta: 29 julio 2017]. ISSN 10284796. Disponible en: scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000300004

Hitziger, M. et al. Maya phytomedicine in Guatemala – Can cooperative research change ethnopharmacological paradigms? A: *Journal of Ethnopharmacology* [en línea]. Elsevier, 2016, Vol. 186, p. 61-72. [Consulta: 20 marzo 2017]. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/j.jep.2016.03.040. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.040>.

José, J. et al. Modelos in vitro para la evaluación y caracterización de péptidos bioactivos. A: . 2013, p. 29-82. [Consulta: 25 julio 2017]. Disponible en: www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/view/38.

Kuete, V. *Medicinal spices and vegetable from africa*. Cameron: Elsevier, 2017. ISBN 9780128092866. [Consulta: 11 marzo 2017] Disponible en: www.sciencedirect.com/science/book/9780128092866

Lastra Valdés, H.A. & Ponce, H. *Bidens pilosa* Linné. A: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2001, Vol. 6, núm. 1, p. 28-33. [Consulta: 20 febrero 2017]. ISSN 10284796. Disponible en: scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962001000100007

Lee, D. & Aparna, P. *Piper: A model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution* [en línea]. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. [Consulta: 10 marzo 2017] ISBN 9780874216561. DOI 10.1007/s13398-014-0173-7.2. Disponible en: http://www.americanbanker.com/issues/179_124/which-city-is-the-next-big-fintech-hub-new-york-stakes-its-claim-1068345
1.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161%5Cnhttp://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991%5Cnhttp://www.scielo.

Madrid, E. & Friedman, W. The developmental basis of an evolutionary diversification of female gametophyte structure in *Piper* and Piperaceae.. A: *Annals of Botany*. 2009, Vol. 103, p. 869-884. [Consulta: 05 marzo 2017]. ISSN 03057364. DOI 10.1093/aob/mcp011. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19202137>

Martínez, E. & Garrido, O. Farmacocinética : antiulcerosos y antiinflamatorios. A: *Rev. Hosp. Jua. Mex.* 2013, Vol. 80, núm. 1, p. 41-53. [Consulta: 10 mayo 2017]. Disponible en:

www.medigraphic.com/pdfs/juarez/ju-2013/ju131h.pdf

Mejia, K. & Renfijo, E. *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana*. Segunda. Lima: Agencia Española de cooperación internacional (AECI) y el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), 2000. [Consulta: 05 marzo 2017]. Disponible en: www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/L017.pdf

Miranda, M. *Farmacognosia y productos naturales: Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas*. 6ª ed. La Habana, Cuba: 2006.

Mgbeahuruike, E.E. et al. South African Journal of Botany Bioactive compounds from medicinal plants : Focus on Piper species. A: , *South African Journal of Botany* [en línea]. SAAB, 2017, Vol. 112, p. 54-69. ISSN 0254-6299. [Consulta: 01 marzo 2017]. DOI 10.1016/j.sajb.2017.05.007. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>.

Mohammed, M. & Osman, W. Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. A: *The Journal of Phytopharmacology* [en línea]. 2014, Vol. 3, núm. 4, p. 275-285. [Consulta: 20 agosto 2017]. Disponible a: http://www.phytopharmajournal.com/Vol3_Issue4_09.pdf.

Mongellil, E. et al. Cytotoxic 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* Inhibits Topoisomerase I Activity. A: *Planta Med.* 1999, Vol. 65, p. 376-378. [Consulta: 02 mayo 2017] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10364848>

Mongelli, E., Coussio, J. i Ciccía, G. Investigation of the Larvicidal Activity of *Pothomorphe peltata* and Isolation of the Active Constituent. A: *Phytotherapy Research*. 2002, Vol. 16, p. 71-72. [Consulta: 02 mayo 2017] Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.753/abstract>

Moraes, M.S., Machado, S.R. & Marques, M.O. Essential Oil of the *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. A: , *Journal of Essential Oil Research* [en línea]. 2004, Vol. 16, núm. 1, p. 15-16. [Consulta: 25 marzo 2017]. ISSN 1041-2905. DOI 10.1080/10412905.2004.9698637. Disponible a:

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10412905.2004.9698637>.

Mujumdar, A. et al. Anti-inflammatory activity of Piperine. A: , *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1990, Vol. 43, p. 95-100. [Consulta: 29 agosto 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2283727>

Muñoz, D.R. & Cuca, E. Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). A: *Rev. Colomb. Cancerol.* 2016, Vol. 20, núm. 3, p. 124-134. [Consulta: 15 febrero 2017]. DOI 10.1016/j.rccan.2015.10.002. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123901516300038>

Nogueira, K.L. et al. In Vivo Antimalarial Activity and Mechanisms of Action of Nerolidylcatechol Derivatives. A: . 2015, Vol. 59, núm. 6, p. 3271-3280. [Consulta: 16 febrero 2017]. DOI 10.1128/AAC.05012-14. Disponible en: <http://aac.asm.org/content/59/6/3271.full>.

Núñez, V. et al. Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A 2 from Bothrops snake venoms : Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. A: *PHYTOCHEMISTRY*. 2005, Vol. 66, p. 1017-1025. [Consulta: 24 abril 2017] DOI 10.1016/j.phytochem.2005.03.026. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896371>

Pacheco, A. et al. Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracato blando de las hojas de *Petiveria alliacea* L . A: *Revista Cubana de Química*. 2006, Vol. 18, núm. 3, p. 78-83. [Consulta: 12 agosto 2017]. Disponible en: www.redalyc.org/html/4435/443543705010/index.html

Parmar, V.S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. A: *Phytochemistry*. 1997, Vol. 46, núm. 4, p. 597-673. ISSN 00319422. [Consulta: 05 marzo 2017]. DOI 10.1016/S0031-9422(97)00328-2. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297003282

Pasto, D. & Johnson, C. *Determinación de estructuras orgánicas*. Barcelona: Reverte, 1981.

Picard, G. et al. Assessment of in vitro pharmacological effect of Neotropical Piperaceae in GABAergic bioassays in relation to plants traditionally used for folk illness by the Yanasha (Peru). A: *Journal of Ethnopharmacology* [en línea]. Elsevier, 2014, Vol. 155, p. 1500-1507. [Consulta: 03 marzo 2017]. ISSN 0378-8741. DOI 10.1016/j.jep.2014.07.039. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.039>.

Pino, N. Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper* L. (PIPERACEA). A: *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Choco: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo* [en línea]. 2008, Vol. 27, núm. 1, p. 67-75. [Consulta: 01 marzo 2017]. Disponible en: [//dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2705040](http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2705040)

Pinto, A. et al. Biomass production in cultivated *Pothomorphe peltata* Miq . (Piperaceae) as a function of harvest time in Manaus , Amazonas State , Brazil . A: *Rev. Bras. Pl. Med.* 2006, Vol. 8, p. 98-101. [Consulta: 11 marzo 2017]. Disponible en: www.sbpmed.org.br/download/issn_06_4/8esp_98_101.pdf

Pinto, A. et al. In vitro cytotoxicity of *Pothomorphe peltata* (L .) Miquel (Piperaceae), isolated 4-nerolidylcatechol and its semi-synthetic diacetyl derivative. A: *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 2006, Vol. 8, p. 205-211. [Consulta: 03 marzo 2017]. Disponible en: www.sbpmed.org.br/download/issn_06_4/8esp_205_211.pdf

Puertas, M. et al. Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. A: , *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [en línea]. 2009, Vol. 14, núm. 2. ISSN 03788741. [Consulta: 15 febrero 2017]. DOI 10.1016/j.jep.2010.10.039. Disponible en: scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962009000200007

Quisbert, E.N. *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora boliviana*. 2006. ISBN 9788477567752. [Consulta: 01 marzo 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=39639>

Rocha, L. et al. In Vivo and In Vitro Antimalarial Activity of 4 - Nerolidylcatechol. A: *Phytotherapy Research*. 2011, Vol. 25, p. 1181-1188. [Consulta: 20 marzo 2017]. DOI 10.1002/ptr.3424.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21302338>

Silva Lima, E. et al. Stability and antioxidant activity of semi-synthetic derivatives of 4-nerolidylcatechol. A: *Molecules*. 2013, Vol. 18, núm. 1, p. 178-189. [Consulta: 20 agosto 2017]. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules18010178. Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/23262447/>

Soto, M. Estudio fitoquímicos y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región amazonas. A: *In Crescendo*. 2015, Vol. 6, núm. 1, p. 33-43. [Consulta: 05 marzo 2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5127582>

Tan, A. & Berridge, M. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: A simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. A: *Journal of Immunological Methods*. 2000, Vol. 238, núm. 1-2, p. 59-68. [Consulta: 21 mayo 2017] ISSN 00221759. DOI 10.1016/S0022-1759(00)00156-3. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593176>

Tebbs, M. *Revision of Piper(Piperaceae) in the New World 3*. Londres: Biodiversity Heritage Library, 1993. [Consulta: 03 marzo 2017]. ISBN 0153121000203. Disponible en: www.biodiversitylibrary.org/part/98680

Trueba, G.P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. A: , *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*. 2003, Vol. 22, núm. 1, p. 48-57. [Consulta: 11 mayo 2017]. ISSN 08640300. Disponible en: bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.htm

Villalba, E. Inflamación I. A: *Revista de Actualización Clínica*. 2014, Vol. 43, p. 2261-2265. [Consulta: 02 mayo 2017] Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttex

ANEXOS

Anexos A. Análisis Estadístico de la Actividad Citotóxica

		Viabilidad_celular
N		15
Parámetros normales ^{a,b}	Media	66,7527
	Desviación típica	10,27099
Diferencias más extremas	Absoluta	,141
	Positiva	,128
	Negativa	-,141
Z de Kolmogorov-Smirnov		,548
Sig. asintót. (bilateral)		,925

a. La distribución de contraste es la Normal.
b. Se han calculado a partir de los datos.

Gráfico 1A: Prueba para determinar la Normalidad

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Viabilidad_celular			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,710	4	10	,092

Gráfico 2A: Prueba de Levene, Homogeneidad

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Viabilidad_celular					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1468,508	4	367,127	437,226	,000
Intra-grupos	8,397	10	,840		
Total	1476,904	14			

Gráfico 3A: Prueba de ANOVA de un factor

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Viabilidad_celular						
HSD de Tukey						
(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
13	25	3,65667*	,74819	,004	1,1943	6,1190
	50	10,22000*	,74819	,000	7,7577	12,6823
	100	18,00667*	,74819	,000	15,5443	20,4690
	200	27,38667*	,74819	,000	24,9243	29,8490
25	13	-3,65667*	,74819	,004	-6,1190	-1,1943
	50	6,56333*	,74819	,000	4,1010	9,0257
	100	14,35000*	,74819	,000	11,8877	16,8123
	200	23,73000*	,74819	,000	21,2677	26,1923
50	13	-10,22000*	,74819	,000	-12,6823	-7,7577
	25	-6,56333*	,74819	,000	-9,0257	-4,1010
	100	7,78667*	,74819	,000	5,3243	10,2490
	200	17,16667*	,74819	,000	14,7043	19,6290
100	13	-18,00667*	,74819	,000	-20,4690	-15,5443
	25	-14,35000*	,74819	,000	-16,8123	-11,8877
	50	-7,78667*	,74819	,000	-10,2490	-5,3243
	200	9,38000*	,74819	,000	6,9177	11,8423
200	13	-27,38667*	,74819	,000	-29,8490	-24,9243
	25	-23,73000*	,74819	,000	-26,1923	-21,2677
	50	-17,16667*	,74819	,000	-19,6290	-14,7043
	100	-9,38000*	,74819	,000	-11,8423	-6,9177

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Gráfico 4A: Prueba Post Hoc: Test de Tukey
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Anexo B. Análisis Estadístico de la Actividad Antiinflamatoria

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra		
		Inhibición_Inflamatoria
N		18
Parámetros normales ^{a,b}	Media	57,9172
	Desviación típica	10,29814
Diferencias más extremas	Absoluta	,166
	Positiva	,166
	Negativa	-,145
Z de Kolmogorov-Smirnov		,703
Sig. asintót. (bilateral)		,707

a. La distribución de contraste es la Normal.
b. Se han calculado a partir de los datos.

Gráfico 1B: Prueba para determinar la Normalidad
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Inhibición_Inflamatoria			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,654	5	12	,664

Gráfico 2B: Prueba de Levene, Homogeneidad
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

ANOVA de un factor					
Inhibición_Inflamatoria					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1800,263	5	360,053	1652,123	,000
Intra-grupos	2,615	12	,218		
Total	1802,878	17			

Gráfico 3B: Prueba de ANOVA de un factor
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: Inhibición_Inflamatoria						
HSD de Tukey						
(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
12,5 ppm	25 ppm	-3,18000*	,38117	,000	-4,4603	-1,8997
	50 ppm	-7,84000*	,38117	,000	-9,1203	-6,5597
	100 ppm	-14,63333*	,38117	,000	-15,9136	-13,3530
	200 ppm	-22,26667*	,38117	,000	-23,5470	-20,9864
	200 ppm AAs	-27,84333*	,38117	,000	-29,1236	-26,5630
25 ppm	12,5 ppm	3,18000*	,38117	,000	1,8997	4,4603
	50 ppm	-4,66000*	,38117	,000	-5,9403	-3,3797
	100 ppm	-11,45333*	,38117	,000	-12,7336	-10,1730
	200 ppm	-19,08667*	,38117	,000	-20,3670	-17,8064
	200 ppm AAs	-24,66333*	,38117	,000	-25,9436	-23,3830
50 ppm	12,5 ppm	7,84000*	,38117	,000	6,5597	9,1203
	25 ppm	4,66000*	,38117	,000	3,3797	5,9403
	100 ppm	-6,79333*	,38117	,000	-8,0736	-5,5130
	200 ppm	-14,42667*	,38117	,000	-15,7070	-13,1464
	200 ppm AAs	-20,00333*	,38117	,000	-21,2836	-18,7230
100 ppm	12,5 ppm	14,63333*	,38117	,000	13,3530	15,9136
	25 ppm	11,45333*	,38117	,000	10,1730	12,7336
	50 ppm	6,79333*	,38117	,000	5,5130	8,0736
	200 ppm	-7,63333*	,38117	,000	-8,9136	-6,3530
	200 ppm AAs	-13,21000*	,38117	,000	-14,4903	-11,9297
200 ppm	12,5 ppm	22,26667*	,38117	,000	20,9864	23,5470
	25 ppm	19,08667*	,38117	,000	17,8064	20,3670
	50 ppm	14,42667*	,38117	,000	13,1464	15,7070
	100 ppm	7,63333*	,38117	,000	6,3530	8,9136
	200 ppm AAs	-5,57667*	,38117	,000	-6,8570	-4,2964
200 ppm AAs	12,5 ppm	27,84333*	,38117	,000	26,5630	29,1236
	25 ppm	24,66333*	,38117	,000	23,3830	25,9436
	50 ppm	20,00333*	,38117	,000	18,7230	21,2836
	100 ppm	13,21000*	,38117	,000	11,9297	14,4903
	200 ppm	5,57667*	,38117	,000	4,2964	6,8570

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Gráfico 4B: Prueba Post Hoc, Test de Tukey
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Anexo C. Preparación de la droga cruda



Gráfico 1C: Materia Vegetal (*Piper peltatum* L.)



Gráfico 2C: Molino



Gráfico 3C: Hojas de *Piper peltatum* L. desecadas



Gráfico 4C: Droga vegetal molida y seca

Anexo D. Control de Calidad de droga cruda



Gráfico 1D: Determinación de cenizas totales



Gráfico 2D: Proceso para determinación de cenizas solubles en H₂O e insolubles en HCl



Gráfico 1D: Determinación de Humedad

Anexo E. Control de calidad del extracto alcohólico



Gráfico 1E: Determinación de Sólidos totales



Gráfico 2E: Prueba de Densidad relativa



Gráfico 3E: Determinación de pH

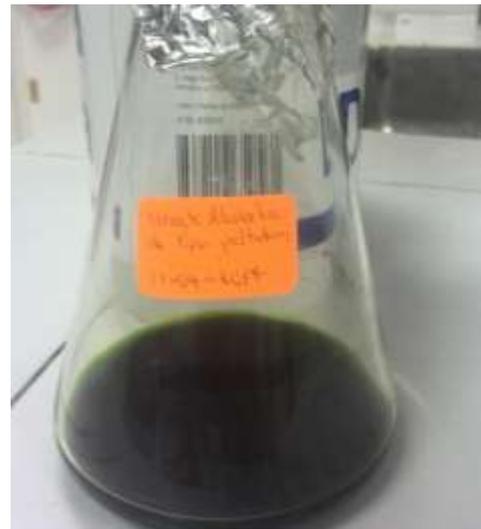


Gráfico 4E: Extracto Alcohólico de *Piper peltatum*.

Anexo F. Tamizaje Fitoquímico



Gráfico 1F: Tamizaje Fitoquímico del extracto acuoso



Gráfico 2F: Tamizaje Fitoquímico del extracto etéreo



Gráfico 3F: Tamizaje Fitoquímico del extracto alcohólico

Anexo G. Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum* L.



Gráfico 1G: Filtración del extracto hidroalcohólico



Gráfico 2G: Liofilización del extracto

Anexo H. Determinación de Fenoles Totales mediante el método de Folin-Ciocalteu



Gráfico 1H: Soluciones preparadas del extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones.



Gráfico 2H: Soluciones madre del extracto

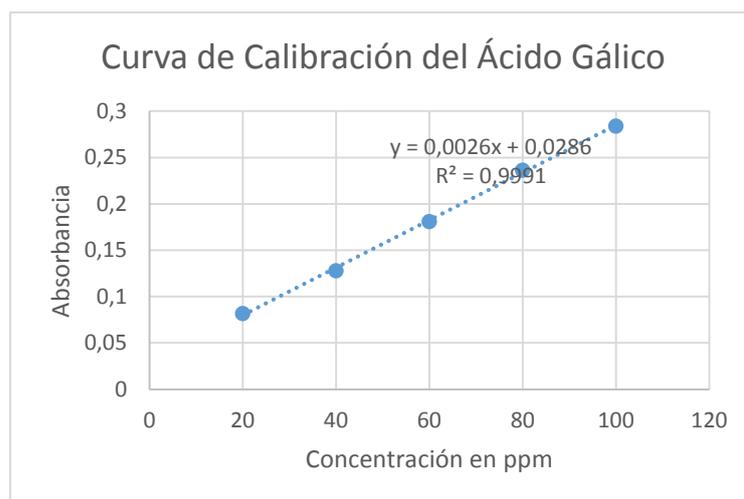


Gráfico 3H: Curva de Calibración del Ácido Gálico
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Anexo I. Determinación de Flavonoides

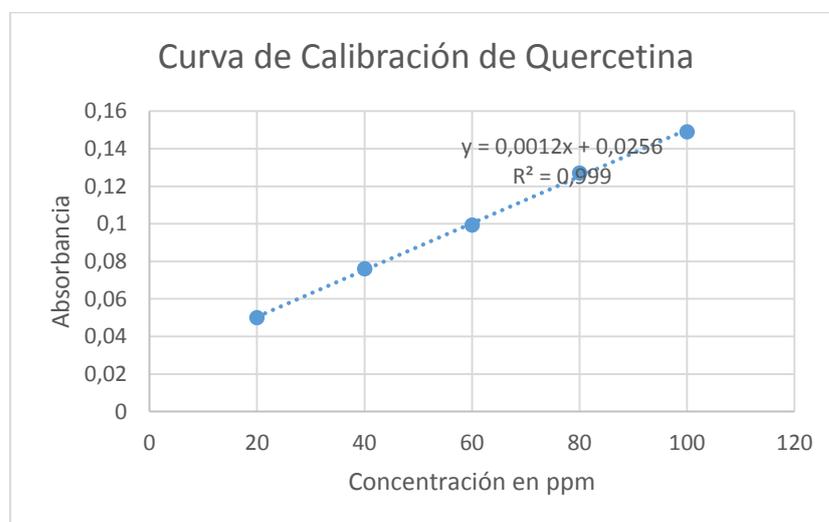


Gráfico 1I: Curva de Calibración de la Quercetina
Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017



Gráfico 2I: Materiales y Reactivos para la determinación de flavonoides



Gráfico 3I: Procedimiento para la determinación de flavonoides

Anexo J. Determinación de la Actividad Antioxidante



Gráfico 1J: Extractos de *Piper peltatum*



Gráfico 2J: Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antioxidante

Concentraciones del extracto	Absorbancias
10 ppm	0.604
50 ppm	0.598
100 ppm	0.595
200 ppm	0.590
500 ppm	0.565
1000 ppm	0.526
1500 ppm	0.490
2000 ppm	0.428
5000 ppm	0.209
7500 ppm	0.138
10000 ppm	0.112

Gráfico 3J: Absorbancias obtenidas de cada concentración de la especie.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Concentraciones del Ácido Gálico	% de Captación de Radicales libres
10 ppm	19.7
20 ppm	28.0
40 ppm	36.9
60 ppm	70.9
80 ppm	78.0
100 ppm	84.7

Gráfico 4J: % de Captación de Radicales libres a diferentes concentraciones del Ácido Gálico.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

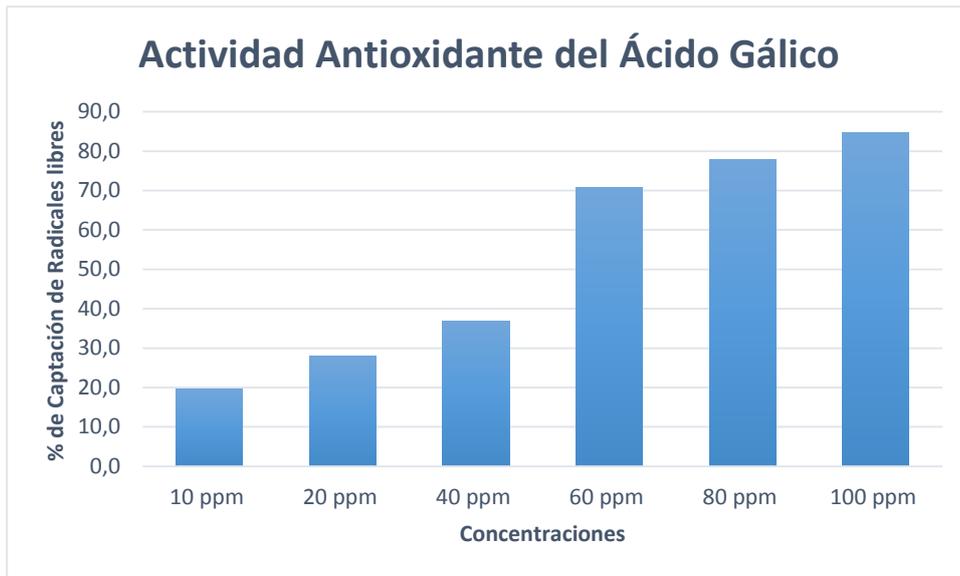


Gráfico 5J: Actividad Antioxidante del Ácido Gálico a diferentes concentraciones.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Anexo K. Aislamiento de neutrófilos en sangre



Gráfico 1K: Colocación de la sangre preparada sobre Ficoll



Gráfico 2K: Separación de los glóbulos rojos de la sangre

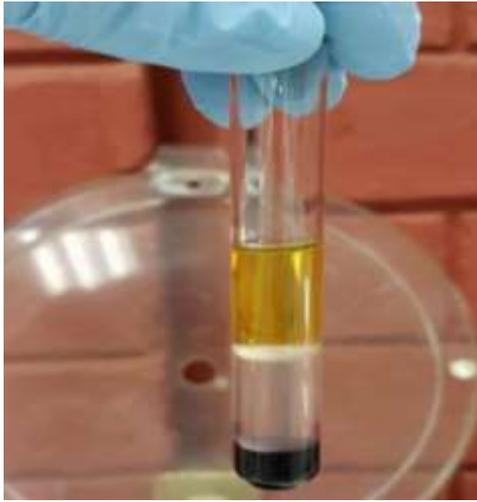


Gráfico 3K: Centrifugación de la sangre con Ficoll



Gráfico 4K: Neutrófilos aislados

Anexo L. Determinación de la Actividad Anti-inflamatoria



Gráfico 1L: Extractos de la especie estudiada



Gráfico 2L: Reactivo Zimosan utilizado en el ensayo

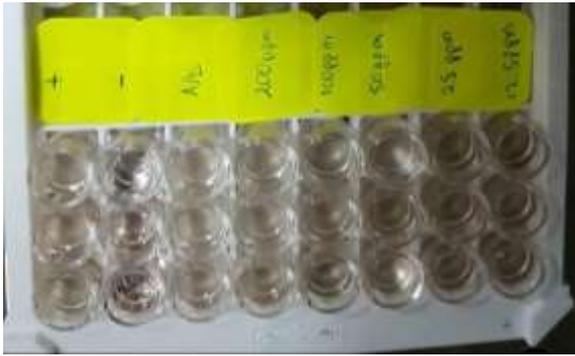


Gráfico 3L: Micropocillos del control positivo, negativo, sustancias de referencia y las diferentes concentraciones del extracto.

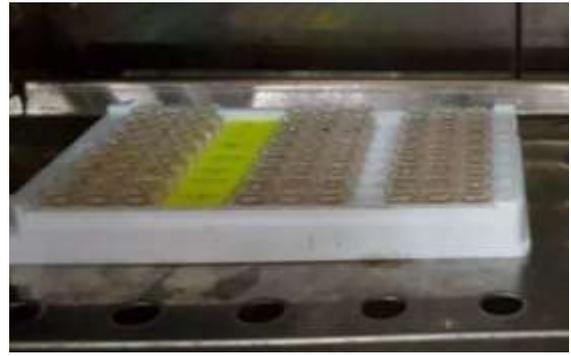


Gráfico 4L: Micropocillos incubados en la estufa.



Gráfico 5L: Micropocillos incubados.



Gráfico 6L: Colocación del reactivo Zimosan en los micropocillos incubados.



Gráfico 7L: Micropipillos incubados listos para su posterior lectura.

Concentración de los extractos µg/mL	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	PROMEDIO
200	0.141	0.144	0.140	0.142
100	0.177	0.175	0.173	0.175
50	0.203	0.204	0.207	0.205
25	0.225	0.226	0.224	0.225
12,5	0.236	0.242	0.238	0.239
Control AAS	0.117	0.119	0.116	0.117
Control Positivo	0.440	0.434	0.436	0.437
Control Negativo	0.050	0.053	0.066	0.056

Gráfico 8L: Absorbancias obtenidas de cada concentración de la especie.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017

Anexo M. Determinación de la Actividad Citotóxica

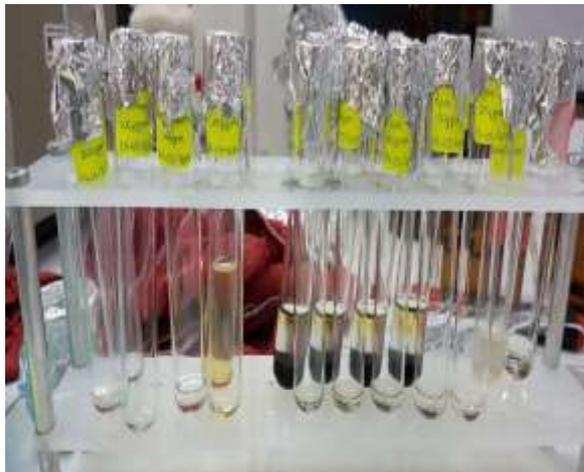


Gráfico 1M: Extractos de la especie estudiada.



Gráfico 2M: Colocación de los extractos en los pocillos.

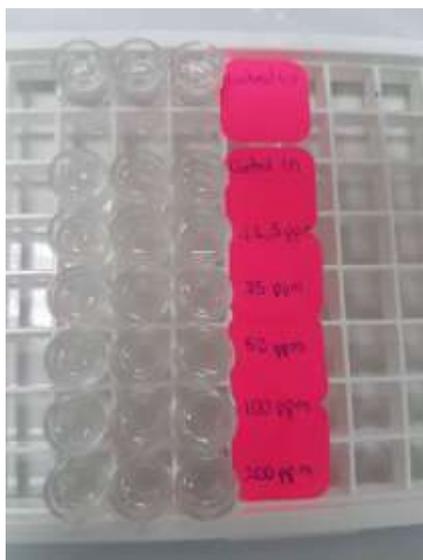


Gráfico 3M: Micropocillos con neutrófilos y extracto de la planta.



Gráfico 4M: Reactivo WTS-1.



Gráfico 5M: Colocación del Reactivo WST-1 en los micropocillos.



Gráfico 6M: Incubación de los micropocillos en la estufa.

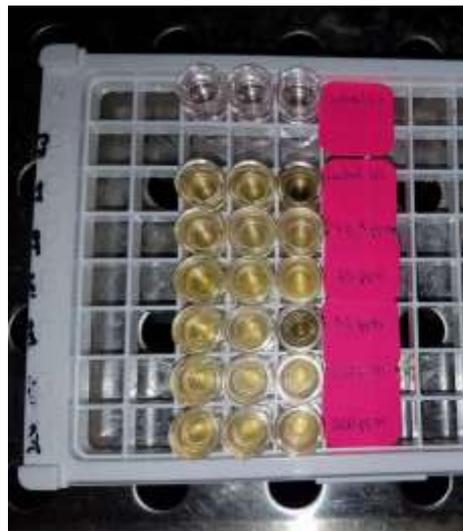


Gráfico 7M: Micropocillos incubados listos para su posterior lectura.

Concentración de los extractos $\mu\text{g/mL}$	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	PROMEDIO
200	0.180	0.184	0.182	0.182
100	0.216	0.217	0.213	0.215
50	0.243	0.245	0.241	0.243
25	0.269	0.270	0.260	0.266
12.5	0.283	0.278	0.277	0.279
Control Positivo	0.350	0.356	0.360	0.355
Control Negativo	0.015	0.009	0.014	0.013

Gráfico 8M: Absorbancias obtenidas de cada concentración del extracto hojas de *Piper peltatum*.

Realizado por: Jahaira Bermúdez, 2017