



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

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

**Trabajo de titulación**

**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA - FARMACÉUTICA**

**AUTORA: VERÓNICA PAOLA ORTIZ CARRASCO**

**TUTORA: Lcda. KAREN L. ACOSTA LEÓN, M.Sc.**

Riobamba - Ecuador  
2018

**©2018, Verónica Paola Ortiz Carrasco**

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 de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo experimental:

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Piper peltatum* L. SOBRE *Rattus norvegicus***, de  
responsabilidad de la Señorita Verónica Paola Ortiz Carrasco, ha sido prolijamente revisado por  
los miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Lcda. Karen Acosta León, M.Sc.  
**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Diego Vinuesa, M.Sc.  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Verónica Paola Ortiz Carrasco, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

---

Verónica Paola Ortiz Carrasco  
C.I. 060347304-2

## **DEDICATORIA**

A Dios por haberme brindado la fuerza y salud necesarias para llegar a cumplir este sueño tan anhelado.

A mis padres por siempre estar conmigo a lo largo de esta trayectoria, gracias a su apoyo incondicional en los momentos más difíciles, sus consejos, su paciencia y amor e inculcarme valores de responsabilidad, respeto, esfuerzo, perseverancia.

A mis hermanos por brindarme su cariño y el aliento necesario para no rendirme.

Vero.

## AGRADECIMIENTO

Al Bqf. Diego Vinueza por el acompañamiento que me brindó a lo largo del desarrollo de este trabajo, por sus consejos y por sus palabras de aliento, siempre resaltando que se debe “Ser más para servir mejor”

A la Lcda. Karen Acosta por su guía, aporte, recomendaciones y su apoyo para culminar esta investigación.

A mi familia por su paciencia, por acompañarme en cada caída y en cada triunfo, y por ser el pilar fundamental de mi vida.

A mis amigos, por su compañía y palabras de apoyo: Joha, Gaby, Pau, Candy, Benja, Sebas y César.

Vero.

## **ABREVIATURAS**

**ENT:** Enfermedades no transmisibles

**ENSANUT:** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

**IECA:** Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

**ARA-II:** Antagonista de los receptores de angiotensina II

**HTA:** Hipertensión arterial

**PUCE:** Pontificia Universidad Católica del Ecuador

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

**AINE:** Antiinflamatorios no esteroideos

**CL50:** Concentración letal media

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia humana

**NCI:** Instituto Nacional del Cáncer

**PAS:** Presión Arterial Sistólica

**PAD:** Presión arterial diastólica

**TCP:** Túbulo contorneado proximal

**HCl:** Ácido clorhídrico

**Na:** Sodio

**K:** Potasio

**Cl:** Cloro

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....</b>	<b>6</b>
1.1. Género <i>Piper</i> .....	6
1.1.1. Características .....	6
1.2. <i>Piper peltatum</i> L.....	7
1.2.1. Descripción botánica.....	7
1.2.2. Sinónimos .....	7
1.2.3. Nombres vernáculos.....	7
1.2.4. Taxonomía.....	7
1.2.5. Distribución geográfica .....	8
1.2.6. Usos etnomédicos .....	8
1.2.7. Composición química.....	9
1.2.8. Actividad farmacológica .....	9
1.3. Compuestos fenólicos.....	10
1.3.1. Biosíntesis de los compuestos fenólicos.....	11
1.3.2. Flavonoides .....	12
1.4. Hipertensión .....	13
1.4.1. Clasificación.....	14
1.4.2. Diagnóstico.....	14
1.4.3. Signos clínicos.....	15
1.4.4. Factores que influyen en la HTA .....	15
1.4.5. Tratamiento no farmacológico .....	16
1.4.6. Tratamiento farmacológico .....	17
1.5. Diuréticos .....	17
1.5.1. Efectos secundarios de los diuréticos .....	17
1.5.2. Clasificación de los diuréticos .....	18
1.5.1.1. Diuréticos de alta eficacia .....	18
1.5.2.2. Diuréticos de eficacia media.....	19
1.5.2.3. Diuréticos de baja eficacia .....	19
1.5.3. Otro tipo de clasificación .....	20



1.5.4.	<i>Diuréticos en la HTA</i> .....	21
--------	-----------------------------------	----

## CAPÍTULO II

1.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	22
2.1.	<b>Lugar de la investigación</b> .....	22
2.2.	<b>Recolección del material vegetal</b> .....	22
2.3.	<b>Identificación del material vegetal</b> .....	22
2.4.	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	22
2.4.1.	<i>Material vegetal</i> .....	22
2.4.2.	<i>Material biológico</i> .....	23
2.4.3.	<i>Fármaco de referencia</i> .....	23
2.4.4.	<i>Materiales de laboratorio</i> .....	23
2.4.5	<i>Equipos</i> .....	24
2.4.6.	<i>Reactivos</i> .....	24
2.5.	<b>Técnicas y métodos</b> .....	24
2.5.1.	<i>Control de calidad de la droga cruda</i> .....	24
2.5.1.1.	<i>Determinación del contenido de Humedad</i> .....	25
2.5.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i> .....	25
2.5.1.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i> .....	26
2.5.1.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i> .....	27
2.5.2	<b>Tamizaje fitoquímico</b> .....	27
2.5.2.1.	<i>Ensayo de Sudán</i> .....	29
2.5.2.2.	<i>Ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner</i> .....	29
2.5.2.3.	<i>Ensayo de Baljet</i> .....	30
2.5.2.4.	<i>Ensayo de Borntrager</i> .....	30
2.5.2.5.	<i>Ensayo de Lieberman Burchard</i> .....	30
2.5.2.6.	<i>Ensayo de Catequinas</i> .....	31
2.5.2.7.	<i>Ensayo de Resinas</i> .....	31
2.5.2.8.	<i>Ensayo de Fehling</i> .....	31
2.5.2.9.	<i>Ensayo de Espuma</i> .....	31
2.5.2.10.	<i>Ensayo de Cloruro férrico</i> .....	31
2.5.2.11.	<i>Ensayo de Ninhidrina</i> .....	32
2.5.2.12.	<i>Ensayo de Shinoda</i> .....	32
2.5.2.13.	<i>Ensayo de Kedde</i> .....	32
2.5.2.14.	<i>Ensayo de Antocianidinas</i> .....	32
2.5.3.	<b>Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>Piper peltatum</i> L.</b> .....	32

2.5.4.	<i>Evaluación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de Piper peltatum L.....</i>	33
2.5.4.1.	<i>Características organolépticas .....</i>	33
2.5.4.2.	<i>Determinación de la densidad relativa .....</i>	33
2.5.4.3.	<i>Determinación del índice de refracción.....</i>	33
2.5.4.4.	<i>Determinación del pH.....</i>	34
2.5.4.5.	<i>Determinación de sólidos totales.....</i>	34
2.5.5.	<i>Determinación de flavonoides totales.....</i>	34
2.5.6.	<i>Determinación de fenoles totales.....</i>	34
2.5.7.	<i>Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....</i>	35
2.5.8.	<i>Determinación de la actividad diurética de hojas de Piper peltatum L.....</i>	35
2.5.8.1.	<i>Preparación de las dosis del extracto y del medicamento diurético.....</i>	35
2.5.8.2.	<i>Animales de laboratorio.....</i>	35
2.5.8.3.	<i>Metodología experimental para determinación de la actividad diurética.....</i>	36
2.5.9.	<i>Determinación de electrolitos en orina .....</i>	36
2.5.10.	<i>Análisis estadístico .....</i>	36

### **CAPÍTULO III**

3.	<b>MARCO DE RESULTADOS.....</b>	37
3.1.	<b>Análisis de la droga cruda .....</b>	37
3.2.	<b>Tamizaje fitoquímico .....</b>	38
3.3.	<b>Parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico.....</b>	40
3.4.	<b>Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....</b>	41
3.5.	<b>Cuantificación de flavonoides totales .....</b>	42
3.6.	<b>Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) .....</b>	43
3.7.	<b>Actividad diurética de las hojas de Piper peltatum L. en ratas (<i>Rattus norvegicus</i>) .....</b>	44
3.8.	<b>Electrolitos urinarios .....</b>	46
3.9.	<b>Análisis estadístico .....</b>	49

	<b>CONCLUSIONES.....</b>	50
--	--------------------------	----

	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	51
--	-----------------------------	----

### **BIBLIOGRAFÍA**

### **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Clasificación Taxonómica de <i>Piper peltatum</i> L.....	8
<b>Tabla 2-1:</b> Clasificación de la presión arterial según la Organización mundial de la Salud y la Sociedad Nacional de Hipertensión en el año 2014.....	14
<b>Tabla 1-2:</b> Materiales utilizados.....	23
<b>Tabla 2-2:</b> Equipos.....	24
<b>Tabla 3-2:</b> Reactivos.....	24
<b>Tabla 1-3:</b> Control de calidad de la droga cruda.....	37
<b>Tabla 2-3:</b> Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de la especie <i>Piper peltatum</i> L.....	38
<b>Tabla 3-3:</b> Parámetros organolépticos y físico-químicos del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper peltatum</i> L.....	40
<b>Tabla 4-3:</b> Resultados de la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>P. peltatum</i> L.....	41
<b>Tabla 5-3:</b> Resultados de la cuantificación de Flavonoides totales del extracto liofilizado de hojas de <i>P. peltatum</i> L.....	42
<b>Tabla 6-3:</b> Resultados de la determinación de la actividad captadora de radicales libres por método DPPH.....	43
<b>Tabla 7-3:</b> Efecto de las hojas de <i>Piper peltatum</i> L. sobre el volumen de orina excretado por ratas de laboratorio durante 6 horas.....	44
<b>Tabla 8-3:</b> Volumen de excreción por hora en cada uno de los tratamientos administrados.....	45
<b>Tabla 9-3:</b> Excreción de electrolitos según la administración de las dosis del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper peltatum</i> L.....	46
<b>Tabla 10-3:</b> Efecto salurético y natriurético del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Piper peltatum</i> L. sobre ratas de laboratorio.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Hojas de la especie <i>Piper peltatum</i> .....	7
<b>Figura 2-1:</b> Síntesis de fenilpropanoides, lignano, flavonoides, taninos.....	12
<b>Figura 3-1:</b> Síntesis de flavonoides.....	12
<b>Figura 1-2:</b> Obtención de extractos utilizados en el tamizaje fitoquímico.....	28
<b>Figura 2-2:</b> Ensayos realizados con el extracto etéreo.....	28
<b>Figura 3-2:</b> Ensayos realizados con el extracto alcohólico.....	29
<b>Figura 4-2:</b> Ensayos realizados con el extracto acuoso.....	29

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Excreción de electrolitos según los tratamientos administrados .....	47
<b>Gráfico 2-3:</b> Test DUNNETT .....	49

## **LISTADO DE ANEXOS**

**ANEXO A.** Hojas de *Piper peltatum* L. recolectadas

**ANEXO B.** Control de calidad del material vegetal

**ANEXO C.** Control de calidad del extracto hidroalcohólico

**ANEXO D.** Tamizaje fitoquímico

**ANEXO E.** Liofilización del extracto

**ANEXO F.** Cuantificación de flavonoides totales

**ANEXO G.** Animales de experimentación (*Rattus norvegicus*)

**ANEXO H.** Administración de los tratamientos

**ANEXO I.** Equipo para actividad diurética

**ANEXO J.** Volúmenes de orina recolectados durante 6 horas

**ANEXO K.** Test estadístico ANOVA

**ANEXO L.** Test Dunnet sobre la excreción de potasio con respecto al control blanco y a la furosemida.

## RESUMEN

El objetivo de investigación fue determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L. sobre el modelo animal *Rattus norvegicus*. Se realizó un tamizaje fitoquímico para la determinación de los metabolitos presentes en el extracto y se evaluaron los parámetros de calidad del mismo. Para la determinación de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante se utilizaron métodos colorimétricos. En la evaluación de actividad diurética se usaron 22 ratas machos con pesos comprendidos entre 200 - 280 gramos, a los que se administró por vía oral dosis de 25, 100 y 200 mg/kg del extracto, para el control positivo se usó furosemida 10 mg/kg y como vehículo carboximetilcelulosa 0,9 %. Posteriormente, se calculó el volumen total de orina y se evaluaron los electrolitos después de 6 horas de la administración de cada tratamiento. En el tamizaje fitoquímico se identificaron metabolitos presentes como compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares reductores, triterpenos, esteroides, entre otros. El contenido de fenoles totales en el extracto fue de  $27,70 \pm 0,33$  %, mientras que de flavonoides se obtuvo  $8,66 \pm 0,90$  %. La actividad antioxidante del extracto mostró valores relativamente bajos. Se comprobó el efecto diurético con una dosis de 100 mg/kg de extracto, el cual que fue similar al control (furosemida); mientras que, a la misma concentración, la excreción del ion potasio fue mayor, comparada con los controles positivo y el vehículo. Por lo anterior, se establece que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L. presenta actividad diurética y se recomienda realizar análisis consecutivos para determinar los compuestos activos responsables del efecto y comprender de mejor manera su mecanismo de acción.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <ACTIVIDAD DIURÉTICA>, <RATTUS NORVEGICUS>, <PIPER PELTATUM>

## ABSTRACT

The objective of the research was to determine the diuretic activity of the hydroalcoholic extract of *Piper peltatum L.* leaves on *Rattus norvegicus* animal model. A phytochemical screening was carried out to determine the metabolites present in the extract and its quality parameters were evaluated. For the determination of phenols, flavonoids and antioxidant activity, colorimetric methods were used. In the evaluation of diuretic activity were used 22 male rats weighing between 200-280 grams, which were administered orally doses of 25, 100 and 200 mg/kg of the extract, for the positive control was used 10 mg/kg of furosemide and as vehicle 0,9 % carboxymethylcellulose. Subsequently, the total volume of urine was calculated and the electrolytes were evaluated in the same urine after 6 hours of administration of each treatment. In the phytochemical screening was identified the presence of metabolites as phenolic compounds, flavonoids, reducing sugars, triterpenes, and steroids among others. The content of total phenols in the extract was  $27,70 \pm 0,33\%$ , while flavonoids obtained  $8,66 \pm 0,90\%$ . The antioxidant activity of the extract obtained relatively low values. The diuretic effect was checked with a dose of 100 mg/kg of extract, which was similar to the control (furosemide); while, at the same concentration, the potassium ion excretion was higher, compared with the positive controls and the vehicle. Therefore, it is established that the hydroalcoholic extract of *Piper peltatum L.* leaves presents diuretic activity and it is recommended to carry out consecutive analyzes to determine the active compounds responsible for the effect and to understand better its mechanism of action.

**Keywords:** <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACOLOGY>, <DIURETIC ACTIVITY>, <LABORATORY RATS>, <PIPER PELTATUM>.



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ENT), representan la mayor causa de morbilidad y mortalidad prematura en la mayoría de los países de América, especialmente, enfermedades respiratorias, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cáncer (Ecuador, 2014, p.668).

Estas enfermedades son conocidas como crónicas y de larga duración. Las ENT aparecen por combinación de distintos factores sean genéticos, fisiológicos, ambientales, etc., además según la OMS el 80% de muertes prematuras son por causa de estas patologías, especialmente en la población de bajos y medios ingresos (OMS, 2018, pp.1-4).

Los niños, adultos y ancianos son la población más vulnerable ante estas enfermedades, las mismas que surgen por causa de factores de riesgo metabólicos como hábitos alimenticios inadecuados e inactividad física, manifestándose como tensión arterial alta, aumento de glucosa y obesidad; sin olvidarse de que el consumo del alcohol y tabaco también afectan de manera significativa (OMS, 2018, pp.1-4).

De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, una cantidad significativa de personas se encuentran afectadas por el sobrepeso y obesidad, causados por la falta de ejercicio físico, alto consumo de alimentos procesados y ultraprocesados, motivo por el cual los hace más propensos a contraer ENT. (Ecuador, 2014, p.668).

En lo que se refiere a América Latina, Ecuador es el país con mayor prevalencia de hipertensión y la primera causa de muerte es la enfermedad cardiovascular secundaria. Según datos estadísticos un 46% de ecuatorianos tienen hipertensión, pero alrededor de un 15 % conocen su enfermedad y siguen el tratamiento adecuado (Ecuador, 2014, p.668).

En Ecuador, alrededor de 3'187.665 de personas mayores a 10 años es prehipertensa; 717.529 entre 10 y 59 años tiene hipertensión arterial, lo que causa un 80 % de enfermedades como accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio y enfermedades renales (OMS, 2013, p.2-3).

El Ministerio de Salud registró hasta el año 2011, 4381 defunciones por hipertensión y 3930 por enfermedades cerebrovasculares.

Según la ENSANUT, la prevalencia de hipertensión arterial hasta el año 2012 en Ecuador en la población de 18 a 59 años fue 9,3 %, donde el 7,5 % corresponde a la población femenina y un 11,2 % a la masculina. Mientras que en casos de prehipertensión los valores fueron de 27,1 % en mujeres y 48,0 % en varones (Ecuador, 2014, p.668).

Actualmente, el arsenal terapéutico de fármacos para tratar la hipertensión arterial es sumamente amplio ya que abarca varias familias con distintos mecanismos de acción. Según la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad Internacional de Hipertensión, las familias de fármacos considerados de primera línea son los diuréticos, bloqueadores  $\alpha$ , bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos, antagonistas de calcio, IECA, ARA-II (Bragulat y Antonio 2001,p.1 ).

Para la adquisición y utilización de fármacos antihipertensivos, se debe tomar en cuenta distintos parámetros, tales como el coste, efectividad, indicaciones y contraindicaciones, efectos secundarios, tolerancia y la presencia de enfermedades asociadas (Bragulat y Antonio, 2001, p.1).

Los fármacos diuréticos han sido utilizados para el tratamiento de HTA por más de 50 años; dentro de éste grupo se encuentran las tiazidas, diuréticos de asa, ahorradores de potasio. Los fármacos tiazídicos son usados como tratamiento inicial en la HTA por su coste relativamente bajo, así como también por su eficacia y tolerabilidad en monoterapia y en combinación con otros fármacos antihipertensivos (Morales, 2008, p.1).

Los diuréticos se encargan de disminuir la reabsorción renal de agua, produciendo diuresis, lo cual se define como un índice de flujo urinario elevado, lo que reduce el flujo sanguíneo y generalmente hace descender la presión arterial (Lozano, 2001, p.3).

Estos fármacos se asocian con varios efectos secundarios que pueden ser aún más riesgosos, produciendo así calambres, debilidad, diarrea, vómito, dolor en articulaciones, además de sordera, sarpullido y en menores casos impotencia y arritmias.

Por lo mencionado anteriormente es necesario la búsqueda de nuevas terapias naturales seguras y eficaces con el fin de disminuir la aparición de efectos adversos, pero sobre todo que permitan el fácil acceso a la población. Como es el caso de la especie *Piper peltatum* L. que según conocimientos ancestrales tiene varios efectos antiinflamatorios, antiartríticos, diuréticos etc., por lo que es usado en esta investigación para determinar específicamente si posee efecto diurético y así contribuir al desarrollo y mejora del sistema de salud.

## JUSTIFICACIÓN

Las plantas medicinales son consideradas de gran importancia en la actualidad. Hace siglos los pueblos encontraron “farmacias naturales” en sus tierras. En Ecuador cada vez hay más personas que cultivan y cosechan sus propios ejemplares, para tratar diferentes tipos de enfermedades (MSP, 2017, p.1).

En Ecuador existen 5172 especies de plantas útiles, donde el 60% son de uso medicinal, 55% son usados como fuente de material de construcción, 30% para uso comestible y 20% para usos social. Estos porcentajes sobrepasan el 100%, lo que indica que varias especies tienen múltiples usos (Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 2008, pp.105-109).

Del total de especies útiles existentes, un 31% corresponden a especies de la Amazonía (Kichwas del Oriente), un 22% a los Wao y mestizos, y menos del 20% provienen de otros 11 grupos étnicos. Esto significa que gran parte de las comunidades indígenas poseen un asombroso conocimiento acerca de plantas, mientras que los mestizos poseen amplios conocimientos, pero en su mayoría han sido ignorados (Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 2008, p.105-109).

Se han registrado en nuestro país, 3.118 plantas medicinales pertenecientes a 206 familias. Estudios realizados en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador revelan que el 45% de estas plantas alivian síntomas diversos, el 26% poseen actividad antimicrobiana, por lo que son usadas para tratar afecciones ocasionadas por virus, bacterias, hongos, parásitos, y el porcentaje restante son grupos de plantas utilizadas para tratamiento de heridas, lesiones e incluso en desórdenes del sistema digestivo (Jaramillo y Guamán, 2018, p.12).

Existen plantas medicinales que resultan eficaces para el control de la HTA, estas plantas poseen actividad diurética, cuyos efectos adversos suelen ser escasos al igual que sus interacciones medicamentosas poco frecuentes. El tratamiento con diuréticos en casos de HTA ayuda al control de parámetros clínicos significativos, lo que se reduce la morbimortalidad cardiovascular (Morales, 2008, p.3).

Los diuréticos más prescritos para el tratamiento de HTA suelen ser la furosemida e hidroclorotiazida; sin embargo, estos fármacos han sido asociados con varios efectos adversos como el desequilibrio hidroelectrolítico, diabetes, alteraciones metabólicas, problemas en la función sexual y disfunción renal (Morales, 2008, p.3).

Gran parte de la población tiene acceso a una amplia variedad de plantas que según conocimientos ancestrales tienen la capacidad de tratar esta enfermedad crónica cuya aparición suele ser silenciosa, además de aliviar muchas otras enfermedades que acechan a un elevado porcentaje de adultos y niños que en la mayoría de casos sus recursos económicos sociales son relativamente bajos, por lo tanto, no tienen la capacidad de acudir a un centro médico.

Es importante que la población conozca acerca de un tratamiento natural para adaptarlo al estilo de vida de aquellos que padezcan dicha enfermedad, mejorando así su salud y minimizando el consumo de medicamentos convencionales que en ciertos casos suelen ser costosos e imposibles de adquirir.

Es necesario que siga promoviéndose la investigación de especies de plantas medicinales ecuatorianas para así contribuir a la ampliación de conocimientos, comprobación de saberes ancestrales, y aprovechar apropiadamente la biodiversidad del país. El uso apropiado e inteligente de estos recursos va mucho más allá del estudio de plantas, sus componentes químicos y los usos que pueden proporcionar (Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 2008, p.110-114).

Los estudios deben estar fuertemente ligados a los derechos de propiedad intelectual, además del cumplimiento de normas, requisitos y permisos correspondientes para uso de planta, las investigaciones conllevan a una mejora en la calidad de vida de la población, basándose en los objetivos del Plan Nacional del Buen Vivir.

La especie *Piper peltatum* L. es rica en metabolitos como compuestos fenólicos, flavonoides, amidas, lignanos, neolignanos, alcaloides, terpenos, hidroquinonas, saponinas y quinonas, además, según la Enciclopedia de Plantas Útiles del Ecuador, afirma que toda la planta tiene actividad farmacológica y es usada como antiinflamatorio, antiartrítico, antidiarreico, calma dolores menstruales y sobre todo las hojas y raíces son potentes diuréticos; por ende, la presente investigación tiene por objeto determinar y evaluar mediante estudios farmacológicos la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de esta especie, cuyos estudios preliminares se realizaron en el laboratorio de productos naturales de la ESPOCH en la Facultad de Ciencias, mientras que los ensayos *in vivo* se los realizó en el Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad diurética del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L. sobre *Rattus norvegicus*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Piper peltatum* L.
- Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas, mediante métodos colorimétricos.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L., basándose en el modelo de captación de radicales libres DPPH.
- Evaluar la actividad diurética por administración oral de tres concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Piper peltatum* L. analizando el volumen de excreción urinaria y electrolitos.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Género *Piper*

El nombre corresponde al género *Piper* L., que fue descrito en 1753 por Carolus Linnaeus. El género *Piper*, perteneciente al orden Piperales y a la familia Piperaceae, ésta familia compuesta de 10 géneros y más de 2000 especies tienen una distribución tropical y subtropical y pueden emplearse de diferentes maneras; varias tribus del Pacífico utilizan algunas especies de *Piper* L. como diuréticos, abortivos, vermífugos, para curar hinchazones, picaduras de serpiente y como anestésicos locales. Éste género es uno de los más grandes géneros de las angiospermas basales que se encuentran en un grupo denominado “paleohierbas” (Sardi, 2012, p.12).

En el Ecuador existen 4 géneros *Piper* y 380 - 400 especies; por lo general son arbustivas que pueden encontrarse en los bosques andinos; además, poseen una amplia gama de actividades biológicas: antitumorales, antibióticos, antifúngicos, insecticidas; razones por las que se han hecho investigaciones fitoquímicas que han encontrado que las especies están compuestas por metabolitos de tipo flavonoide, amida, propinilfenoles, lignanos, neolignanos, kavapironas y terpenos (15).

##### 1.1.1. Características

Son plantas leñosas, suelen ser arbustos, lianas e incluso árboles pequeños; sus hojas son simples, alternas, tallos articulados y nudos ensanchados (Sardi, 2012, p.12).

Las flores son distintivas, se encuentra agrupadas en espigas o apéndices de manera vertical. Las flores maduran en una drupa y junto con las otras conforman un fruto múltiple; éste se vuelve carnoso y en varias especies tiene una peculiar fragancia cuando madura.

El género *Piper* tiene una amplia gama de actividades biológicas, suelen ser empleados como antibióticos, antitumorales, antifúngicos, etc., todo esto gracias a los compuestos tipo flavonoide que han sido encontrados.

## 1.2. *Piper peltatum* L.



**Figura 1-1: Hojas de la especie *Piper peltatum***  
FUENTE: (Abreu O. y Morgado M., 2012)

### 1.2.1. Descripción botánica

Se considera un sub-arbusto simple, erecto, que puede llegar a medir de 0,6 m hasta 2 o 5 metros de alto, tiene tallos verdes pálidos con nodos que pueden ser leñosos, posee hojas verdes opacas en el haz y pálidas en el envés, son anchas tipo ovaladas, peltadas, agudas en el ápice con 9-14 nervios que surgen de la base y 3-6 nervios secundarios, las inflorescencias están conformadas de 4-25 espigas de color blanco, la bráctea elíptico-lanceolada de 1,5 a 3 cm de longitud y el fruto es sub-globoso aproximadamente de 0.5-0.8 milímetros (Madrid y Friedman, 2009, p.74).

### 1.2.2. Sinónimos

Los principales sinónimos de la planta son:

*Heckeria peltata* (L.) Kunth

*Peperomia peltata* (L.) A. Dietr.

*Piper pruinatum* Kunth

*Piper speciosum* Kunth

*Pothomorphe peltata* (L.) Miq (Trópicos, 2018)

### 1.2.3. Nombres vernáculos

Esta planta es conocida con los nombres de “anisillo”, “cordoncillo”, “Santa María”

### 1.2.4. Taxonomía

En la Tabla 1-1 se muestra la clasificación taxonómica de *Piper peltatum* L.

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

<b>TAXONOMÍA</b>	
<b>REINO</b>	Plantae
<b>DIVISIÓN</b>	Magnoliophyta (Angiospermas)
<b>CLASE</b>	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
<b>SUBCLASE</b>	Magnoliidale
<b>ORDEN</b>	Piperales
<b>FAMILIA</b>	Piperaceae
<b>GÉNERO</b>	<i>Piper</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>P. peltatum</i>

**Fuente:** (Jiménez I. y López I., 2006, p.13) (Abreu O. y Morgado M., 2012)

**Realizado por:** Verónica Ortiz, 2018

### 1.2.5. Distribución geográfica

La distribución de *Piper peltatum* se registra en países como Bolivia, Brasil, Colombia, Caribe, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Guyana, Honduras, Madagascar, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Surinam y Venezuela (Trópicos, 2018).

En Ecuador se encuentran mayoritariamente en la región costa, en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santo Domingo, Santa Elena, Los Ríos, Guayas, El Oro y Loja; las zonas de menor ocurrencia son en las provincias de Bolívar, Cotopaxi, Cañar, Chimborazo, Carchi, Imbabura, Sucumbíos, Azuay, Zamora Chinchipe, Morona Santiago, Pastaza, Orellana y Napo (Jorgensen y León, 1999, p.34).

Según Jorgensen y León (1999, p.35) manifiestan que esta especie se encuentra en un rango altitudinal de 0 a 1000 msnm, mientras que Hanan y Mondragón (2009, p.45) indican que esta especie perenne se encuentra a lo largo de ríos, plantaciones o cultivos de cacao en climas tropicales y húmedos a una temperatura media de 21,5°C.

### 1.2.6. Usos etnomédicos

Roing (1974, p.57) afirma que toda la planta tiene uso medicinal; en Colombia es reconocida por su poderosa actividad diurética, especialmente de hojas y raíces; tiene además propiedades rubefacientes, como tónico estomacal y antiinflamatorio. El jugo de la planta es empleado en quemaduras y un principio activo aromático de la raíz es estimulante del sistema linfático.



Las tribus indígenas conocen estas plantas como anises y las emplean en tratamientos para diarrea, disentería, dolor de estómago, caries dentales, además tiene propiedades cicatrizantes e incluso es usada contra picaduras de serpientes (Ponz, 2005, p14).

Por lo general los usos más comunes que se atribuyen a la especie *Piper peltatum* en el Ecuador son: infecciones, lesiones, problemas del sistema digestivo, antídotos contra venenos, inflamación, desórdenes en tejidos subcutáneos, problemas del sistema respiratorio, problemas del sistema urogenital, gestación, parto, posparto, problemas del sistema nervioso y sensorial, problemas nutricionales y desórdenes metabólicos (Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 2008, p.113).

### **1.2.7. Composición química**

Diversos estudios fitoquímicos de la especie *Piper peltatum* demuestran que existe la presencia de metabolitos secundarios como son amidas, lignanos, neolignanos, alcaloides, terpenos, hidroquinonas, derivados del ácido benzoico, y principalmente tienen una gran cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas (Soto, 2015, p.43). Además de los metabolitos identificados, esta especie posee un compuesto representativo fitoquímicamente como es la piperina (piperamida).

En un estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper peltatum* se encontró un 70,4% de hidrocarburos sequiterpénicos, un 27,1% de trans-murolo-4(14)-5-dieno, 18,7% de trans-cariofileno. 9,9% de biciclogermacreno, limoneno, d-cadineno (Bottia et al, 2007, pp.1-3).

Un componente con elevado potencial farmacológico (antioxidante y citotóxico) que se encuentra en raíces, hojas e inflorescencias es el 4-nerolidilcatecol; otros componentes derivados del catecol que fueron aislados tienen propiedades antivirales como el peltatol A, B y C (Gustafson et al., 1992, p.2809).

### **1.2.8. Actividad farmacológica**

Un estudio sobre el extracto metanólico de hojas de *Piper peltatum* demostró un importante efecto antiinflamatorio, por la administración oral de 20 mg/kg equivalentes a 2,50 gramos de planta seca por kilogramo de peso corporal, comparado con un fármaco antiinflamatorio (AINE) como es la fenilbutazona de 80 mg/kg para contrarrestar un edema en ratas inducido por carragenina (Desmarchelier, Slowing y Ciccía, 2000, pp.1-3).

Otro estudio acerca de la actividad antioxidante *in vitro* de hojas secas y pulverizadas de *Piper peltatum*, demostró mediante el ensayo de “Poder antioxidante reductor de hierro” (FRAP) y del ensayo DPPH (Capacidad de atrapamiento del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) que uno de los extractos usados fue el más prominente con un 75% de inhibición radical DPPH, mientras que con el ácido ascórbico fue de un 68% (Puertas et al., 2009, pp.1-6).

Acerca de la actividad biológica de esta especie se ha demostrado que el extracto acuoso de las hojas tiene efecto alelopático a una concentración del 10 %, debido a la inhibición del 50% del crecimiento de raicillas de trigo, pero no se han realizado posteriormente estudios más profundos acerca de este efecto (Mongelli et al., 1997, p.89).

En cuanto a la actividad larvicida se realizaron estudios *in vitro* contra *Aedes aegypti*, vector causante de la enfermedad conocida como fiebre del dengue hemorrágico. Para ello se usó el extracto metanólico de las hojas, donde presentó una CL50 de 398 µg/ml, por lo que el metabolito 4-nerolidilcatecol exhibió una buena actividad larvicida contra esta cepa (Mongelli et al., 2002, p.72).

Otro estudio realizado con el extracto diclorometano-metanol de la raíz de *Piper peltatum* se logró evidenciar que posee actividad anti VIH *in vitro*, posteriormente se realizó un fraccionamiento químico del extracto de la raíz y se logró identificar que contiene dímeros de catecol prenilados y peltatoles A, B y C (Gustafon et al., 1992, pp.2809-2811).

Varios ensayos *in vitro* han demostrado que el extracto de *P. peltatum* tienen valor potencial para actividad antitumoral, donde el extracto metanólico de las hojas de la planta muestra un 22% de inhibición de los tumores de vesícula coronaria con relación al clorhidrato de doxorubicina; además se evidenció que el compuesto 1 de la misma, presentaba toxicidad *in vitro* para células tumorales KB de la misma forma presentó inhibición de la enzima topoisomerasa humana (Mongelli et al., 1999, pp.404-406).

### **1.3. Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de micronutrientes distribuidos ampliamente en el reino vegetal, son antioxidantes y pueden ayudar a prevenir ciertos tipos de enfermedades; se clasifican en: flavonoides, polifenoles y ácidos fenólicos (Figura 3-1), éstos forman un grupo amplio de metabolitos secundarios presentes en las plantas con diferentes estructuras químicas y propiedades (Porrás et al., 2009, p.122). Además de estar relacionados con la calidad sensorial de

los vegetales, estos compuestos fitoquímicos son de gran interés nutricional porque contribuyen al mantenimiento de la salud humana.

La actividad antioxidante se asocia con el rol de protección ante enfermedades cardiovasculares e incluso cancerígenas, se le atribuyen también propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, vasodilatadoras (Porrás et al., 2009, p.122).

Los fenoles tienen un anillo aromático con uno o varios grupos hidroxilo y otros derivados funcionales. Son importantes para el crecimiento y reproducción de las plantas al unirse con cadenas largas de ácidos carboxílicos porque forman sustancias como la suberina y cutina.

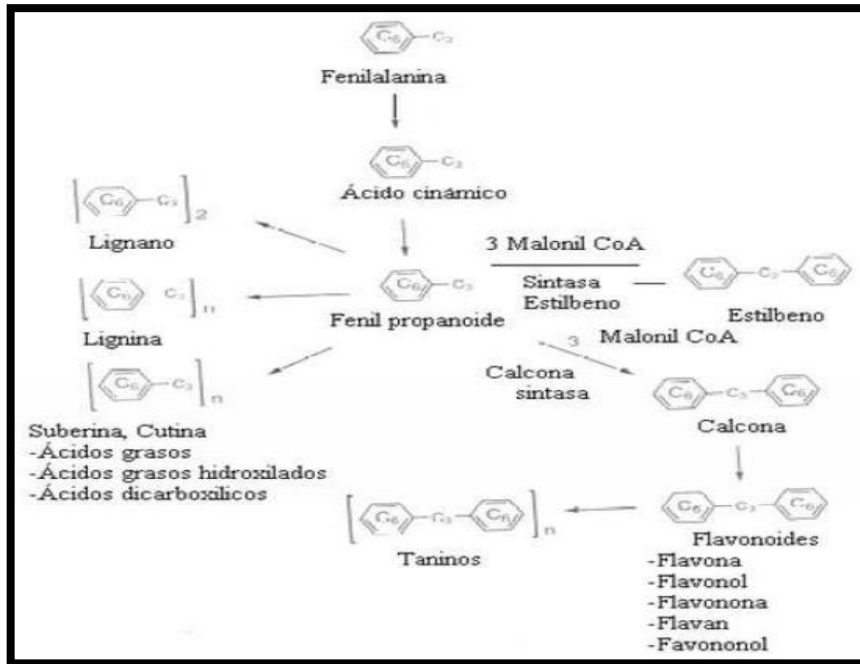
Según Shahidi y Naczk (2004, pp.1-16) a los fenoles se les atribuye las funciones de antibióticos, pesticidas naturales, protectores de rayos UV, diuréticos, entre otros.

### ***1.3.1. Biosíntesis de los compuestos fenólicos***

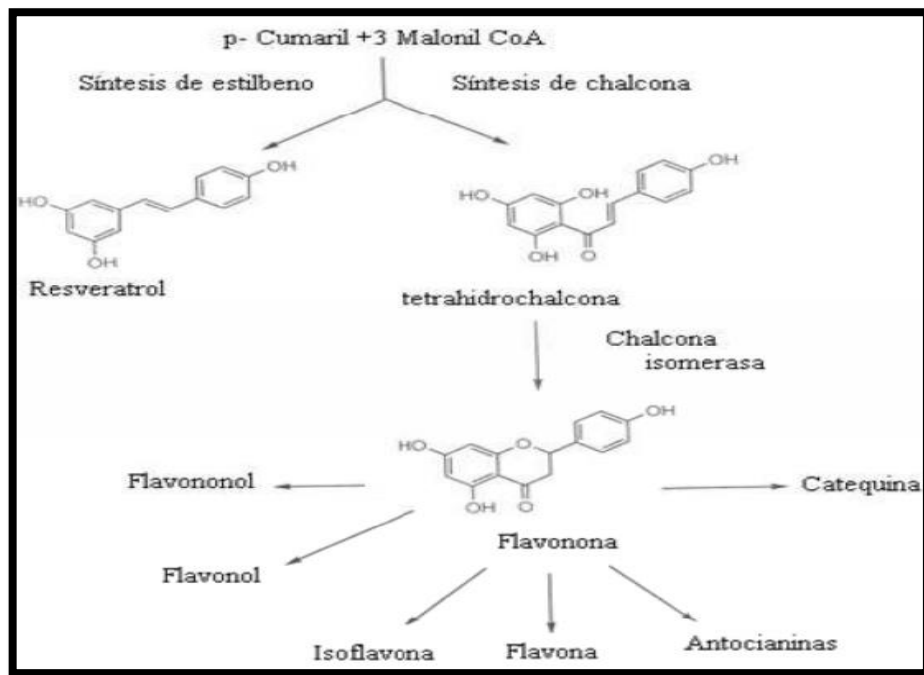
Los compuestos fenólicos se sintetizan por la vía del ácido shikímico, con la producción de la fenilalanina y tirosina comienzan los procesos enzimáticos. La enzima fenilalanina amonio liasa actúa con la fenilalanina para la producción de estos compuestos.

El ácido gálico y sus derivados se generan por la vía del dehidroshikimato deshidrogenasa a partir del 3-dehidroshikimato. En la vía fenilpropanoide, la fenilalanina se convierte en ácido cinámico por la acción de la fenilalanina amonio liasa, y es hidroxilado por la enzima denominada ácido cinámico 4-hidroxilasa (Peñarrieta et al., 2014, pp.68-79).

El ácido 4-cumárico se esterifica por la coenzima A, con la acción del ácido 4-cumárico ligasa coenzima A. Los flavonoides son sintetizados por la vía de los fenilpropanoides formándose primero las chalconas por la reacción que cataliza la chalcona sintetasa con el ácido cumárico coenzima A y como sustrato la malonil-coenzima A (Peñarrieta et al., 2014, pp.68-79).



**Figura 2-1: Síntesis de fenilpropanoides, lignano, flavonoides, taninos.**  
Fuente: Shahidi y Naczki; 2004



**Figura 3-1: Síntesis de flavonoides**  
Realizado por: Shahidi y Naczki; 2004

### 1.3.2. Flavonoides

Los flavonoides son polifenoles responsables del color amarillo de las flores y frutos. Se pueden distinguir grupos como isoflavonoides, flavonas, anticianos, antocianidinas (Figura 4-1). Este grupo tiene actividades farmacológicas importantes sobre todo en modelos *in vitro* como: antioxidantes, antiinflamatorias, antibióticas; pero en los modelos *in vivo* no se ha demostrado su

actividad antioxidante, así como también sigue siendo una incertidumbre su efectividad contra el cáncer, a pesar de que estudios indican que puede disminuir el riesgo de aparición de esta enfermedad, no existe explicación estadística relevante (Peñarrieta et al., 2014, pp.68-79).

#### **1.4. Hipertensión**

La HTA se ha convertido en una de las enfermedades más predominantes del mundo, se considera como un importante factor de riesgo cardiovascular, además de ser la causa frecuente de enfermedades renales, insuficiencia cardíaca, etc. («OMS | Hipertensión» [sin fecha]) (OMS, 2018, p.1).

Según la OMS, la hipertensión, conocida comúnmente como tensión arterial elevada, es un trastorno donde los vasos sanguíneos tienen una tensión alta persistente, la misma que puede causar daños (OMS, 2018, p.1).

Cuando el corazón bombea sangre, ésta ejerce una fuerza contra las paredes de los vasos sanguíneos, lo que se conoce como tensión arterial; cuando la tensión es muy alta, el corazón hace más esfuerzo para bombear (OMS, 2018, p.1).

La tensión arterial tiene 2 componentes, uno de ellos denominado tensión sistólica, es el valor que refleja la fuerza que ejerce la sangre sobre la pared de las arterias al contraerse el corazón y expulsarla; por lo general éste valor es mayor que el segundo que corresponde a la tensión diastólica, la misma que se define como la fuerza ejercida por la sangre, pero cuando el corazón está relajado.

Por lo general la mayoría de personas con hipertensión no presentan síntomas, pero en ocasiones suelen aparecer dolores de cabeza, vértigo, dificultad respiratoria y hemorragias nasales.

La HTA se asocia con otros factores de riesgo cardiometabólicos como diabetes, sobrepeso, obesidad, entre otros.

Cuando la hipertensión no se controla o no se detecta a tiempo puede provocar infartos de miocardio, ensanchamiento del corazón e insuficiencia cardíaca. La hipertensión se puede diagnosticar fácilmente y el tratamiento de la misma suele ser eficaz casi en totalidad, gracias al amplio campo terapéutico (OMS, 2018, p.1).

### 1.4.1. Clasificación

Según la OMS y la SIH (Sociedad Nacional de Hipertensión) en el año 2014 clasificaron a la hipertensión arterial como se muestra en la Tabla 1-2 a continuación:

**Tabla 2-1:** Clasificación de la presión arterial según la Organización mundial de la Salud y la Sociedad Nacional de Hipertensión en el año 2014

<i><b>Categoría</b></i>	<i><b>Valores</b></i>
<i>Presión Normal</i>	120/80 mmHg hasta 129/84 mmHg
<i>Presión en el límite alto de normalidad</i>	130/85 mmHg hasta 139/89 mmHg
<i>Hipertensión grado 1</i>	140/90 mmHg hasta 159/99 mmHg
<i>Hipertensión grado 2</i>	160/100 mmHg hasta 179/109 mmHg
<i>Hipertensión grado 3</i>	>180/>110 mmHg
<i>Hipertensión sistólica aislada</i>	>140/<90 mmHg

Fuente: OMS, 2014, p.1

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

### 1.4.2. Diagnóstico

La HTA es detectada por su medición en condiciones adecuadas y con el equipo respectivo; consta de un procedimiento que se realiza de forma habitual en las consultas de atención primaria o en oficinas de farmacia (Lozano, 2001, p.76).

Korotkoff describió cinco fases (ruidos) determinantes para la medición de la presión arterial, como son:

FASE I: Reconocimiento de un sonido abrupto, relativamente alto e intenso. En esta fase se indica el valor de la presión arterial sistólica.

FASE II: El sonido es claramente más intenso y prolongado.

FASE III: El sonido sigue siendo alto, claro y se percibe un murmullo al inicio y desaparición.

FASE IV: Existe una pérdida brusca de intensidad de sonido, junto con un ligero murmullo casi continuo. Varias veces el último sonido se logra reconocer

FASE V: Los ruidos desaparecen. Corresponde al valor de la presión arterial diastólica.

Con la realización de tres tomas de presión en óptimas condiciones se puede decir que el paciente tiene hipertensión arterial cuando ésta se encuentra por encima de 140 mmHg (PAS) y de 90 mmHg (PAD) (Lozano, 2001, p.77).

### ***1.4.3. Signos clínicos***

Los pacientes que son diagnosticados con HTA primaria no presentan signos claros, sino cuando son sometidos a la determinación correspondiente.

Los síntomas más comunes son: mareo, dolor de cabeza, visión borrosa, zumbidos en los oídos, etc. (Lozano, 2001, p.77)

La HTA avanzada afecta a diferentes órganos como el corazón, ojos, riñón, etc., y los síntomas se presentarán de acuerdo al órgano afectado.

### ***1.4.4. Factores que influyen en la HTA***

Existen varios factores que influyen sobre la HTA como son:

#### **Edad**

Por lo general la relación entre la HTA y la edad es directamente proporcional, a pesar de que no en todos los casos sucede lo mismo, sino que hay una diferencia entre lo que es la presión sistólica y diastólica.

#### **Factores genéticos**

Cuando una persona de la familia tiene HTA, es probable que la descendencia pueda adquirir esta enfermedad.

#### **Factores ambientales**

Hoy en día el estrés es un factor muy importante en casos de hipertensión arterial, además los ambientes psicosociales, una disminución del nivel socioeconómico, factores como ansiedad, depresión, perfeccionismo e incluso agresividad, contribuyen a que los niveles de tensión arterial tengan una gran variabilidad (Lozano, 2001, p.76).

#### **Obesidad**

La mitad de los hipertensos tienden a ser personas con sobrepeso u obesidad, esto se debe al excesivo aporte calórico y retención de sodio, lo que conlleva al aumento del volumen plasmático e inclusive a un alto gasto cardíaco (Lozano, 2001, p.76).

El gasto cardíaco está ligado con la resistencia a la insulina y con la hiperactividad simpática, por lo que en estos casos es determinante la elección de un fármaco antihipertensivo idóneo para un paciente hipertenso obeso.

#### **Consumo de cloruro de sodio**

El consumo diario de sal es una medida importante recomendada a los pacientes con HTA; esta medida debe mantenerse al inicio del tratamiento con antihipertensivos, especialmente con pacientes tratados con diuréticos, con el fin de evitar la hipocalemia. Los fármacos alfa y beta bloqueantes y los IECA tienen mejor acción cuando el paciente cuida su consumo de sal ya que así a dosis más bajas de los mismos se logra conseguir un mejor control tensional. Esto no sucede así con los antagonistas de calcio (Lozano, 2001, p.77).

#### **Consumo de alcohol**

Varios estudios han deducido que el alcohol también contribuye a la aparición de HTA, por lo cual la disminución de su consumo, al igual que la sal, constituyen un complemento idóneo junto con el tratamiento farmacológico, para que de esta forma los antihipertensivos tengan una mejor respuesta en el paciente, reduciendo así el riesgo de padecimiento de accidentes cerebrovasculares (Lozano, 2001, p.77).

#### **Consumo de café**

Estudios realizados indican que la ingesta de café eleva los valores de PAS y PAD en un 14 y 10 mmHg respectivamente. Por ello para que el paciente normotenso se realice un control de la presión arterial debe abstenerse de ingerir café por lo menos un lapso de 10-12 horas, caso contrario podría haber resultados falsos positivos, mientras que en un paciente hipertenso consumidor habitual de café ya se tienen antecedentes y no habría interferencia en el control de la enfermedad (Lozano, 2001, p.77).

#### **Tabaquismo**

La suspensión del consumo de tabaco es una medida obligatoria para los pacientes hipertensos, para disminuir el riesgo cardiovascular y cerebrovascular. Esta medida debe ser permanente y se logra con la ayuda y control del personal sanitario (médico, enfermera, farmacéutico) (Lozano, 2001, p.78).

#### ***1.4.5. Tratamiento no farmacológico***

El tratamiento no farmacológico es una de las medidas menos invasivas, cuyo objetivo consiste en lograr que la población hipertensa reduzca la morbilidad y mortalidad cardiovascular. Más que



medidas preventivas se ha considerado una modificación en el estilo de vida de los pacientes, incluso con mayor énfasis en pacientes que padecen otras enfermedades como diabetes mellitus, dislipidemia, etc. (Lozano, 2001, p.78)

#### **1.4.6. Tratamiento farmacológico**

Si la situación del paciente no cambia con el tratamiento no farmacológico y la presión arterial continúa elevada durante varios períodos sucesivos, es recomendable que el paciente complemente sus hábitos con el abordaje farmacológico indicado para su patología y según las condiciones en las que se encuentre.

Al seleccionar los fármacos antihipertensivos se busca que reduzcan la frecuencia cardíaca, volemia, resistencia periférica, contrarresten los mecanismos hipertensivos endógenos y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (Lozano, 2001, p.78).

### **1.5. Diuréticos**

Los fármacos diuréticos son medicamentos que favorecen a la diuresis por la acción que realizan sobre el contenido y volumen de la orina.

Los diuréticos por lo general disminuyen la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , pero puede interferir también con cationes como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , con los aniones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y con el ácido úrico (Fernández, 2015, p.405).

Estos fármacos son esencialmente usados en tratamientos de

- Hipertensión arterial,
- Insuficiencia cardíaca,
- Enfermedades renales agudas o crónicas,
- Diabetes insípida,
- Síndrome nefrótico,
- Cirrosis hepática (Fernández, 2015, p.405).

#### **1.5.1. Efectos secundarios de los diuréticos**

Con el tratamiento diurético pueden presentarse algunos efectos adversos:

- Desequilibrio hidroelectrolítico,
- Hiponatremia,

- Hipopotasemia (diuréticos tiacídicos y los de Asa de Henle),
- Hiperpotasemia (diuréticos ahorradores de potasio),
- Hipocalcemia (diuréticos de Asa),
- Hipomagnesemia (diuréticos tiazídicos y de Asa) (Torres, 2006, p.610).

Cuando se produce un desequilibrio hidroelectrolítico surgen síntomas como:

- Sequedad de boca,
- Alteraciones gastrointestinales,
- Letargia,
- Somnolencia,
- Convulsiones,
- Cefalea,
- Dolores musculares,
- Arritmias,
- Hipotensión (Torres, 2006, p.610).

### ***1.5.2. Clasificación de los diuréticos***

Tradicionalmente la clasificación de los diuréticos por su lugar de acción, es el mayor determinante en cuanto a la potencia de cada uno de ellos, los cuales se detallan a continuación:

#### ***1.5.1.1. Diuréticos de alta eficacia***

Actúan en el Asa de Henle, específicamente en los segmentos diluyentes cortical y medular. Con éstos el porcentaje de sodio y cloro eliminado es aproximadamente del 25%, agua en un 15%, acompañado de la eliminación de potasio y aumento de la actividad de aldosterona; son conocidos como diuréticos de alto techo (Fernández, et al., 2003, p.1).

Inhiben la reabsorción de  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ , además, al ejercer un ligero efecto inhibitorio de la anhidrasa carbónica, puede excretarse bicarbonato (Morales, 2013, p.15).

También se incrementa la excreción renal de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ , así como la de bicarbonato por ejercer un ligero efecto inhibitorio sobre la anhidrasa carbónica.

Los diuréticos de alto techo son capaces de producir una diuresis elevada, acceden a la luz tubular de la porción ascendente del asa de Henle al ser secretados en el TCP (túbulo contorneado

proximal). Son capaces de bloquear selectivamente el cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ , impidiendo la reabsorción de agua e iones (Morales, 2013, p.15).

A este grupo pertenecen las familias:

1. **Sulfamoilbenzoatos:** fuerosemida, bumetanida, piretanida
2. **Derivados de la sulfonilurea:** toresamida
3. **Derivado fenoxiacético y tiazolidonas:** ácido etacrínico y etozolina respectivamente (Fernández et al., 2003, p.1).

#### *1.5.2.2. Diuréticos de eficacia media*

Los diuréticos de eficacia media actúan en la porción inicial del túbulo contorneado distal, al igual que en la porción final del segmento diluyente cortical. Éstos inhiben el cotransportador de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  y aumentan la excreción del  $\text{Na}^+$  en un 5-10%, además, del  $\text{Cl}^-$  y el agua. De igual forma existe un incremento en la eliminación de potasio y magnesio; reducen la excreción de bicarbonato al inhibir moderadamente la anhidrasa carbónica y permiten la reabsorción del  $\text{Ca}^{++}$  (lo contrario a los diuréticos de asa).

Fármacos cuya estructura es diferente a las tiazidas pero que tienen un similar comportamiento son los denominados tiazida like (clortalidona, indapamida) (Morales, 2013, p.14).

Dentro del grupo de las tiazidas se encuentran:

1. **Tiazidas e hidrotiazidas:** altiazida, hidroclorotiazida, bendroflumetiazida
2. **Derivados de tiazidas:** clopamida, clortalidona, indapamida (Fernández et al., 2003, p.1).

#### *1.5.2.3. Diuréticos de baja eficacia*

A este grupo de diuréticos de baja eficacia pertenecen:

##### **1. Ahorradores de potasio**

Los antagonistas de aldosterona como la espironolactona y eplerenona compiten y ocupan reversiblemente un receptor en el citoplasma de las células epiteliales del túbulo distal, impidiendo la retención de  $\text{Na}^+$  y la excreción de  $\text{K}^+$ .

Otro tipo de estos diuréticos son la amilorida y el triamtereno que bloquean los canales de  $\text{Na}^+$  del túbulo distal y de los colectores, así inhiben la reabsorción de sodio en un 2-5% y reducen la excreción de potasio.

## 2. Inhibidores de la anhidrasa carbónica

Un claro ejemplo de estos es la acetazolamida, este fármaco tiene una débil potencia como diurético, pero actúa inhibiendo la anhidrasa carbónica en las células epiteliales del túbulo contorneado proximal, así disminuye la producción de bicarbonato e hidrógeno, por lo tanto, se reduce la reabsorción de sodio y ocasiona una diuresis leve.

Puede originar acidosis metabólica leve por la pérdida del bicarbonato; mientras disminuyen los niveles de bicarbonato en sangre lo hace también el efecto diurético al pasar varios días de tratamiento.

## 3. Diuréticos osmóticos

Son fármacos hidrofílicos, no se reabsorben, se excretan por los túbulos colectores, su administración es intravenosa y son útiles para eliminar agua, pero no retienen el sodio. Estos diuréticos por lo general actúan en segmentos permeables al agua como en el túbulo proximal, asa de Henle, y túbulo contorneado; aumentan la presión osmótica tubular, disminuye la reabsorción de agua, incrementa el volumen de excreción de orina, por lo que producen una diuresis por osmosis.

Los más usados son el manitol, isosorbida, úrea y glicerina (Fernández et al., 2003, p.1).

### 1.5.3. Otro tipo de clasificación

Según Fernández (2015, p.409) los diuréticos se clasifican de acuerdo a diversos criterios:

#### Según su eficacia o potencia diurética

- **Del alto techo:** furosemida, bumetanida, torasemida
- **De bajo techo:** hidroclorotiazida, clortalidona, andapamida, xipamida, triamtereno, amilorida, espironolactona, manitol, acetazolamida (Fernández, 2015, p.409).

#### Según la duración del efecto diurético

- **Corta:** Menos de 8 horas: furosemida bumetanida
- **Media:** 12-24 horas: torasemida, tiazidas, xipamida, acetazolamida, triamtereno, amilorida
- **Larga:** Mayor a 24 horas: clortalidona, espironolactona (Fernández, 2015, p.409)

#### Según el lugar de acción

- **Túbulo proximal:** osmóticos tiazidas, diuréticos de Asa, amilorida
- **Asa de Henle:** furosemida, bumetanida, torasemida, adapamida, xipamida

- **Túbulos distal y colector:** tiazidas, clortalidona, espironolactona, amilorida, triamtereno (Fernández, 2015, p.409).

#### Según su estructura química

- **Sulfamoilbenzoatos:** furosemida, bumetenida
- **Benzotiacidas:** tiazidas e hidrotiazidas, derivados de tiazidas (indapamida, clortalidona)
- **Aminopteridinas:** triamtereno
- **Mineralcorticoides:** espironolactona (Fernández, 2015, p.409).

#### Según su mecanismo de acción

- **Inhibidores de la anhidrasa carbónica:** acetazolamida
- **Diuréticos osmóticos:** manitol
- **Inhibidores del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (diuréticos del Asa):** furosemida, toresamida
- **Inhibidores del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  (diuréticos tiazídicos):** clorotiazida, hidroclorotiazida, indapamida, clortalidona.
- **Inhibidores de los canales de  $\text{Na}^+$  de la membrana epitelial (diuréticos ahorradores de potasio):** amilorida, triamtereno
- **Antagonistas de receptores de mineralcorticoides (antagonistas de aldosterona, diuréticos ahorradores de potasio):** espironolactona (Fernández, 2015, p.409).

#### 1.5.4. Diuréticos en la HTA

Los diuréticos son capaces de aumentar la diuresis y la natriuresis, modificando el transporte iónico en los distintos lugares de la nefrona llegan a estimular la excreción de agua y electrolitos, principalmente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Al eliminarse el agua disminuye el volumen extracelular y el gasto cardíaco, por lo tanto, se reduce la presión arterial (Morales, 2013, p.14).

Los fármacos más usados como antihipertensivos y que pertenecen a este grupo de diuréticos son las tiazidas que aparecieron en la década de los cincuenta como los fármacos más eficaces y mejor tolerados para el tratamiento de HTA.

Las tiazidas se pueden administrar en monoterapia disminuyendo la presión arterial y potencian el efecto de otros antihipertensivos como los IECA y los ARA II (Morales, 2008, pp.198-201).

## CAPÍTULO II

### 1. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales y el Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Esta investigación cuenta con el permiso del Ministerio del Ambiente, dentro del Contrato Marco de Acceso a Recursos genéticos del Programa de Investigación Científica MAE-DNB-CM-2018-0086 denominado “Estudio de la Biodiversidad en el Ecuador, Ecología, Conservación y su potencial uso sostenible”

#### 2.2. Recolección del material vegetal

Las hojas de *Piper peltatum* L. fueron recolectadas en la provincia de Manabí en la comunidad La Unión del cantón El Carmen, en las coordenadas:

Latitud: 0°16'11" Sur

Longitud: 79°25'26" Oeste

#### 2.3. Identificación del material vegetal

La identificación de la planta se realizó en el Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato por el PhD. José Homero Vargas López.

#### 2.4. Materiales, equipos y reactivos

##### 2.4.1. Material vegetal

Se utilizaron las hojas de la especie *Piper peltatum* L., que fueron secadas en la estufa a 120° durante 12 horas y posteriormente trituradas. El material triturado fue colocado en fundas de papel selladas para su conservación y almacenamiento.

#### 2.4.2. *Material biológico*

Ratas de laboratorio (*Rattus norvegicus*) adquiridas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias.

#### 2.4.3. *Fármaco de referencia*

El control positivo fue furosemida para determinar la actividad diurética.

#### 2.4.4. *Materiales de laboratorio*

Los materiales usados durante el transcurso de la investigación se presentan en la Tabla 1-2.

**Tabla 1-2:** Materiales utilizados

<b>Materiales de laboratorio</b>		
✓ Cápsulas de porcelana	✓ Pinzas para crisol	✓ Balones de aforo de 10ml, 25 ml y 100 ml
✓ Crisoles de porcelana	✓ Frascos ámbar	✓ Probetas de 10 ml y 50 ml
✓ Reverbero	✓ Trípode	✓ Micropipetas automáticas de 100 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L
✓ Espátula	✓ Embudo	✓ Puntas desechables azules y amarillas
✓ Picnómetros	✓ Vasos de precipitación de 250 ml, 500 ml y 1000 ml	✓ Mortero con pistilo
✓ Vidrio reloj	✓ Tubos de ensayo	✓ Jaulas metabólicas
✓ Varillas de agitación	✓ Gradilla	✓ Papel aluminio y papel filtro
✓ Piseta	✓ Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml	✓ Cánula de 18G
✓ Pera de succión	✓ Balón esmerilado de 500 ml	✓ Guantes, cofia, mascarilla, mandil

**Realizado por:** Verónica Ortiz, 2018

## 2.4.5 Equipos

**Tabla 2-2:** Equipos

✓ Estufa Memmert SNB 400	✓ Mufla IVYMEN N 8
✓ Molino Arthur H. Thomas C.O	✓ Rotavapor BUCHI R110
✓ Sonicador Branson 2510	✓ Vórtex mixet MRC S1-100
✓ Balanza analítica	✓ Liofilizador Thermo Scientific
✓ Desecador	✓ pH-metro
✓ Congelador	✓ Refractómetro
✓ Bomba de vacío	✓ Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
✓ Cámara UV modelo cc20	✓ Cámara de flujo laminar

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

## 2.4.6. Reactivos

**Tabla 3-2:** Reactivos

✓ Reactivo de Mayer	✓ Reactivo de catequinas	✓ Nitrito de Sodio al 5 %
✓ Reactivo de Wagner	✓ Reactivo de Resinas	✓ Hidróxido de sodio 1M
✓ Reactivo de Dragendorff	✓ Reactivo de antocianidinas	✓ Tricloruro de aluminio 10 %
✓ Reactivo de Baljet	✓ Reactivo de Shinoda	✓ Ácido gálico
✓ Reactivo de Fehling	✓ Magnesio metálico	✓ Reactivo de Folin Ciocalteu
✓ Reactivo de Lieberman Burchard	✓ Cloruro de sodio	✓ Solución estándar de quercetina
✓ Reactivo de Borntrager	✓ Etanol al 96 % y 70 %	✓ Solución DPPH
✓ Reactivo de cloruro férrico	✓ Agua destilada	✓ Solución de furosemida y Carboximetil celulosa sódica

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

## 2.5. Técnicas y métodos

### 2.5.1. Control de calidad de la droga cruda

El control de calidad de la droga cruda se realizó por triplicado para la identificación de los componentes presentes en la planta. Los parámetros evaluados fueron: humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico.



### 2.5.1.1. Determinación del contenido de Humedad

El exceso de agua en el material vegetal contribuye al crecimiento bacteriano, micótico y especialmente fomenta el deterioro de la droga mediante procesos de hidrólisis. Por este motivo se debe determinar este parámetro en todas las drogas vegetales, inclusive en aquellas que absorben fácilmente humedad.

Las farmacopeas muestran límites apropiados como guía donde por lo general el contenido de humedad debería encontrarse entre 8-14%, aunque lo establecido en la USP 35 manifiesta que debería ser menor al 10% (Villar, 1994, p.72).

La metodología usada para la determinación del contenido de humedad fue mediante el método gravimétrico.

#### **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.

#### **Cálculo:**

$$Hg = \frac{M2 - M1}{M2 - M} * 100$$

#### **Donde:**

**Hg:** porcentaje de pérdida en peso por desecación

**M2:** masa de la cápsula con la muestra

**M1:** masa de la cápsula de la muestra desecada

**M:** masa de la cápsula vacía

**100:** factor matemático

### 2.5.1.2. Determinación de cenizas totales

#### **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.

**Cálculos:**

$$C = \frac{M2 - M}{M1 - M} * 100$$

**Donde:**

**C:** porcentaje de cenizas totales

**M:** masa del crisol vacío

**M1:** masa del crisol con la muestra

**M2:** masa del crisol con la ceniza

**100:** factor matemático

*2.5.1.3 Determinación de cenizas solubles en agua*

**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  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Trascurrido el tiempo el crisol fue trasladado a una estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  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:

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

**Ca:** porcentaje de cenizas solubles en agua

**M2:** masa del crisol con las cenizas totales

**Ma:** masa del crisol con las cenizas solubles en agua

**M1:** masa del crisol con la muestra

**M:** masa del crisol vacío

**100:** factor matemático

#### 2.5.1.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

##### **Procedimiento:**

A las cenizas totales 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. Posteriormente, esto se filtró y el residuo fue lavado con agua caliente 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 la estufa a 105 °C por un determinado tiempo y después fue transferido al crisol de porcelana para su 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:

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

**B:** porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

**M:** masa del crisol vacío

**M1:** masa del crisol con la muestra

**M2:** masa del crisol con las cenizas totales

**100:** factor matemático

#### 2.5.2 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje o screening fitoquímico es una técnica útil para la identificación cualitativa de metabolitos presentes en las drogas vegetales, sea por métodos de coloración o precipitación.

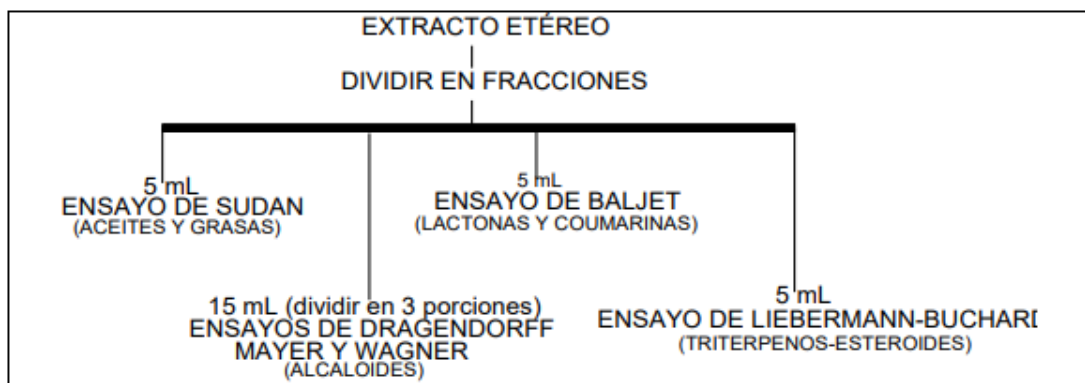
Las hojas previamente secas y trituradas fueron sometidas a ensayos sucesivos con solventes de menor a mayor polaridad, teniendo en cuenta el esquema siguiente:



**Figura 1-2: Obtención de extractos utilizados en el tamizaje fitoquímico**

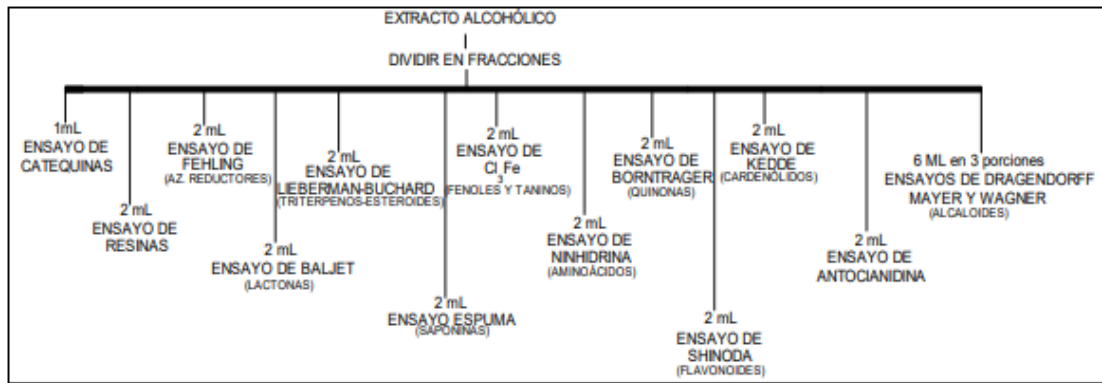
Fuente: Miranda, 2006, pp.27-28

Se realizaron los ensayos con cada uno de los extractos obtenidos, tal como se muestran en las siguientes figuras:



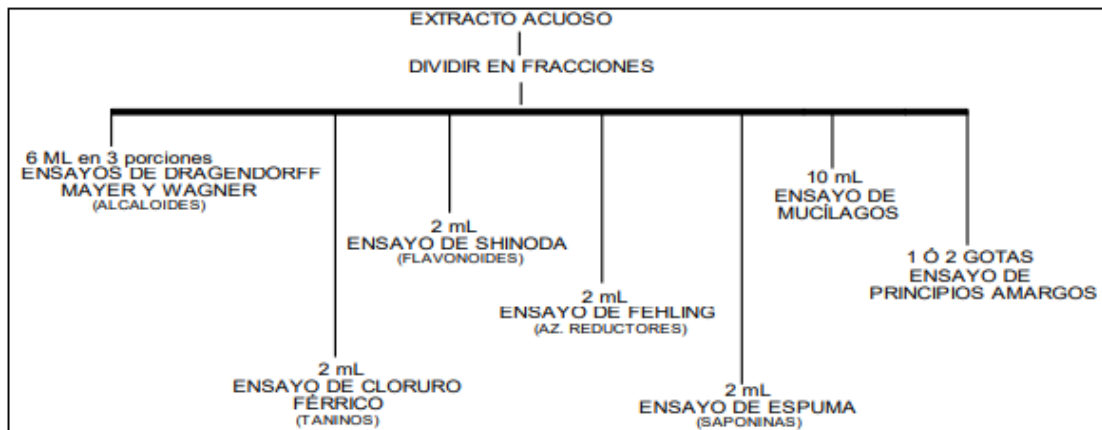
**Figura 2-2: Ensayos realizados con el extracto etéreo**

Fuente: Miranda, 2006, pp.31-32



**Figura 3-2: Ensayos realizados con el extracto alcohólico**

Fuente: Miranda, 2006, pp.31-32



**Figura 4-2: Ensayos realizados con el extracto acuoso**

Fuente: Miranda, 2006, pp.31-32

### 2.5.2.1. Ensayo de Sudán

Permite identificar compuestos grasos presentes en el extracto. A una alícuota del extracto se adicionó 1 ml del reactivo de Sudán III o Sudán IV, posteriormente se calentó en baño maría hasta su evaporización. El ensayo se considera positivo cuando aparecen gotículas rojas en el líquido sobrante o residuos del mismo color en las paredes del tubo.

### 2.5.2.2. Ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner

Permite identificar la presencia de alcaloides.

#### **Dragendorff**

A la alícuota del solvente orgánico se la evaporó en baño maría y luego se redisolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 %, si el extracto es acuoso colocar 1 gota de ácido clorhídrico concentrado

en el agua y posteriormente se colocó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. El ensayo es positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez (++) , precipitado (+++)

### **Mayer**

Se procedió de la misma forma antes mencionada hasta obtener una solución ácida, se añadió cloruro de sodio para luego proceder a filtrar, finalmente se colocó 2-3 gotas del reactivo de Mayer. El ensayo es positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez (++) , precipitado (+++)

### **Wagner**

Al igual que en los casos anteriores a partir de la solución ácida se añadió 2 o 3 gotas del reactivo y los resultados se clasificaron de la misma forma.

#### *2.5.2.3. Ensayo de Baljet*

Este ensayo permite identificar compuestos lactónicos (cumarinas) presentes en el extracto. Si el extracto no era alcohólico, se evaporó en baño maría y se redisolvió en 1ml de alcohol, luego se añadió 1 ml del reactivo de Baljet. El ensayo es positivo cuando existe la aparición de coloración roja (+) o precipitado rojo (++) .

#### *2.5.2.4. Ensayo de Borntrager*

Permite reconocer la presencia de quinonas. Si la alícuota no tenía cloroformo, se evaporaba en baño de agua y el residuo se restauraba con 1ml de cloroformo, posteriormente se adicionó 1 ml de hidróxido de sodio al 5 %, agitando constantemente hasta la mezcla de fases y por último se dejó reposar para volverlas a separar. El ensayo se considera positivo cuando la fase acuosa se colorea de rosado (++) o roja (+++)

#### *2.5.2.5. Ensayo de Lieberman Burchard*

Permite el reconocimiento de triterpenos y esteroides. Si la alícuota para el ensayo no tenía cloroformo, se evaporó en baño de agua y el residuo se restauró con 1ml de cloroformo, luego se añadió 1 ml de ácido acético, se homogenizó y finalmente se colocó por las paredes del tubo 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. En un ensayo positivo se aprecian las siguientes coloraciones:

1. Rosado-azul (rápido)

2. Verde intenso-visible (rápido)
3. Verde oscuro-negro-final de la reacción

#### 2.5.2.6. *Ensayo de Catequinas*

Identifica la presencia de catequinas en el extracto. De la solución alcohólica se tomó una gota con un capilar, se colocó sobre papel filtro y sobre la mancha se aplicó una solución de carbonato de sodio. Posteriormente se llevó a luz UV. El ensayo se considera positivo al observar la mancha de color verde carmelita.

#### 2.5.2.7. *Ensayo de Resinas*

Detectar la presencia de resinas en el extracto. A 2 ml de la solución alcohólica se adicionó 10 ml de agua destilada. Este ensayo se considera positivo cuando existe la aparición de precipitado

#### 2.5.2.8. *Ensayo de Fehling*

Permite reconocer la presencia de azúcares reductores. Si la alícuota del extracto no estaba en agua se procedió a evaporar el solvente en baño maría, el residuo se reconstituyó con 1-2 ml de agua, posteriormente se adicionó 2 ml del reactivo y se calentó en baño de agua por 5-10 min. El ensayo se considera positivo si la solución presenta un color rojo o se observa precipitado rojo.

#### 2.5.2.9. *Ensayo de Espuma*

Reconocimiento de saponinas esteroidales o triterpénicas. Si la alícuota se encontraba en alcohol se procedió a diluir con agua y se agitó fuertemente durante 5-10 min. El ensayo es positivo cuando existe la presencia de espuma de 2 mm en la superficie y persiste por más de dos minutos.

#### 2.5.2.10. *Ensayo de Cloruro férrico*

Permite identificar la presencia de compuesto fenólicos y taninos en el extracto vegetal. A una alícuota del extracto alcohólico se adicionó 3 gotas de la solución de tricloruro férrico 5 %; al extracto es acuoso se añadió acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de tricloruro férrico 5 %. El ensayo se considera positivo al presenciar las siguientes coloraciones:

1. Coloración rojo-vino (compuestos fenólicos)
2. Coloración verde intensa (taninos tipo pirocatecólicos)
3. Coloración azul (taninos tipo pirogalotánicos)

#### 2.5.2.11. *Ensayo de Ninhidrina*

Permite reconocer la presencia de aminoácidos o aminas. Se tomó una alícuota de extracto alcohólico, otra del residuo que quedó en baño maría y por último del extracto orgánico para ser mezclados cada uno con 2 ml de la solución de ninhidrina al 2 % y finalmente se procedió a calentar las mezclas en baño de agua por 5-10 min. El ensayo es positivo cuando se observa una coloración azul violácea.

#### 2.5.2.12. *Ensayo de Shinoda*

Determina la presencia de flavonoides en el extracto vegetal. En el extracto alcohólico se diluyó con 1ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedazo de cinta de magnesio metálico, luego de la reacción se esperó 5 min y se procedió a añadir 1ml de alcohol amílico para homogenizar y dejar en reposo hasta la separación de fases. El ensayo es positivo cuando se observa la fase amílica de color amarillo, naranja o rojo intensos.

#### 2.5.2.13. *Ensayo de Kedde*

Permite determinar la presencia de glicósidos cardiotónicos. Del extracto alcohólico se extrajo una alícuota y se mezcló con 1 ml del reactivo, dejándolo reposar de 5-10 min. El ensayo se considera positivo al presenciar una coloración violácea persistente por 1-2 horas.

#### 2.5.2.14. *Ensayo de Antocianidinas*

Identifica la presencia de estructuras de secuencia C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> de flavonoides. 2 ml del extracto etanólico se calentaron durante 10 min con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado, se enfrió y adicionó posteriormente 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico, luego se dejó reposar hasta la separación de fases. Un ensayo positivo se observa cuando hay la presencia de color rojo o marrón en la fase amílica.

#### 2.5.3. *Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado de Piper peltatum L.*

Se colocó 100 g de droga cruda en un frasco ámbar, luego se colocó 1000 ml 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. Luego el extracto obtenido se filtró para concentrarlo en el rotavapor a 60



°C quedando una solución libre de alcohol. Por último, el extracto filtrado se congeló y liofilizó por un determinado tiempo hasta quedar libre de agua.

#### **2.5.4. Evaluación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L.**

##### *2.5.4.1. Características organolépticas*

- Determinación del olor
- Determinación del color
- Determinación del sabor
- Determinación del aspecto

##### *2.5.4.2. Determinación de la densidad relativa*

#### **Procedimiento:**

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:

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

#### **Donde:**

**D:** densidad relativa

**M2:** peso del picnómetro con agua

**M1:** peso del picnómetro con la muestra de ensayo

**M:** peso del picnómetro vacío

##### *2.5.4.3. Determinación del 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.

#### 2.5.4.4. *Determinación del pH*

Es un parámetro que determina la acidez o alcalinidad de las soluciones. Para ello se usó un pH-metro que fue calibrado con una solución reguladora de pH y posteriormente se determinó el valor del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L.

#### 2.5.4.5. *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:

$$St = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

**Donde:**

**St:** sólidos totales

**Pr:** masa de la cápsula con el residuo

**P:** masa de la cápsula vacía

**V:** volumen del extracto

**100:** factor matemático

#### 2.5.5. *Determinación de flavonoides totales*

La determinación de flavonoides se realizó tomando una porción del extracto liofilizado y se añadió 4 ml de agua destilada junto con 0,3 ml de nitrito de sodio al 5 %, luego de 5 minutos de reposo se adicionó 0,3 ml de cloruro de aluminio al 10 % y se procedió a vortear durante 1 min y se colocó en completa oscuridad durante otros 5 min.

Transcurrido el tiempo, se añadió 2 ml de hidróxido de sodio 1 M para homogenizar y realizar las lecturas correspondientes a 510 nm (Boukhris et al., 2012, p.2).

#### 2.5.6. *Determinación de fenoles totales*

Para la determinación de fenoles totales se tomó una alícuota de la muestra a la que se añadió 15 ml de agua destilada, al mismo tiempo se adicionó 1,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu; al

transcurrir 8 min se colocó 3,75 ml de carbonato de sodio al 7,5 % y se aforó a 25 ml con agua destilada para vortear por 1 min y reposar 2 horas en completa oscuridad.

Transcurrido el tiempo establecido se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a 765 nm (García et al., 2010, p.1).

#### ***2.5.7. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH***

Se tomó una alícuota de la muestra y se adicionó 3,9 ml del reactivo DPPH y posteriormente 100 µL de la solución de ácido gálico o del extracto para homogenizar y dejar reposar 1 hora en la oscuridad. Al pasar el tiempo determinado se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 515 nm (Bouaziz et al, 2010, p.879).

#### ***2.5.8. Determinación de la actividad diurética de hojas de Piper peltatum L.***

##### *2.5.8.1. Preparación de las dosis del extracto y del medicamento diurético*

Se preparó una solución madre de 55 mg/ml usando como disolvente carboximetilcelulosa sódica al 0,9 % de la cual posteriormente se formularon dosis de 25, 100 y 200 mg/kg para el tratamiento respectivo.

El control negativo fue carboximetilcelulosa sódica al 0,9 %. El control positivo se realizó con furosemida sólido oral de 40 mg, a una dosis de 10 mg/kg, suspendida en carboximetil celulosa sódica 0,9% (Ansari et al., 2016, p.12).

##### *2.5.8.2. Animales de laboratorio*

Los animales de experimentación fueron ratas (*Rattus norvegicus*) machos, cuyos pesos estaban entre 200-280 gramos, criadas y mantenidas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias bajo las siguientes condiciones:

Temperatura:  $22 \pm 2$  °C

Humedad:  $50 \pm 10$  %

Fotoluminiscencia: 12 horas de claridad y 12 horas de oscuridad

Alimentación: Balanceado para roedor 20 g al día

Hidratación: Agua purificada (cantidad suficiente)

### *2.5.8.3. Metodología experimental para determinación de la actividad diurética*

Los grupos de experimentación se dividieron al azar y se privaron de alimento pero no de agua durante 12 horas antes de los tratamientos. A cada animal se administró 45 min antes de los tratamientos, una solución isotónica (cloruro de sodio 0,9 %), en dosis de 5 ml/100 g de peso corporal para imponer una carga uniforme de líquido (Chen et al. 2014).

Transcurrido un tiempo las ratas se dividieron en 5 grupos y se les administró por vía oral los siguientes tratamientos:

- Grupo 1: 1 ml de carboximetilcelulosa sódica 0,9 %
- Grupo 2: 1 ml de furosemida 10 mg/kg
- Grupos 3, 4 y 5: 1 ml de extracto liofilizado de hojas de *Piper peltatum* L., en concentraciones de 25,100 y 200 mg/kg respectivamente.

Posterior a la administración se colocaron los animales en jaulas metabólicas durante 6 horas para la recolección y medición de orina en probetas de 10 ml. Por último, se realizaron las determinaciones de electrolitos.

### *2.5.9. Determinación de electrolitos en orina*

La determinación de los electrolitos sodio, potasio y cloro se llevó a cabo en el centro de análisis clínico “El Cisne”, se empleó el método de electrodo selectivo, utilizando 95 µL de muestra; el análisis se realizó de manera rápida y en condiciones adecuadas de humedad y temperatura.

### *2.5.10. Análisis estadístico*

Los datos obtenidos de la presente investigación se tabularon en el programa estadístico Minitab y Excel. Los resultados se analizaron con el test ANOVA y el post test Dunnet considerando un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS

#### 3.1. Análisis de la droga cruda

El control de calidad de la especie *Piper peltatum* L. se realizó por triplicado, los resultados se muestran en la Tabla 1-3.

**Tabla 1-3:** Control de calidad de la droga cruda

Parámetros de calidad	Hojas de <i>Piper peltatum</i> %	Referencia USP 35-NF 30
<i>Humedad</i>	9,32% ± 0,14	≤ 10%
<i>Cenizas totales</i>	9,17% ± 1,25	≤ 12%
<i>Cenizas solubles en agua</i>	6,98% ± 0,16	≤ 7%
<i>Cenizas insolubles en Ácido Clorhídrico</i>	2,92% ± 0,08	≤ 5%

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

El cumplimiento de los parámetros de calidad de la droga cruda requiere principal atención, especialmente para comprobar que se encuentre libre de impurezas.

El contenido de humedad fue de 9,32%, este valor se encuentra dentro de las referencias de la USP 35-NF 30; el control de este parámetro es importante para evitar el crecimiento microbiano, micótico y la hidrólisis de ciertos constituyentes que pueden provocar el deterioro de la droga.

Las cenizas totales representan el contenido de residuo inorgánico que se obtiene al calcinar una droga por lo general son carbonatos, sulfatos, salicilatos, fosfatos; el valor de cenizas totales calculado fue de 9,17% que se encuentra dentro de los valores normales según la USP 35-NF30; el residuo es de color blanco y es el producto de incineración de los minerales contenidos en la muestra vegetal y de la materia extraña (tierra) que puede contener (Cuellar, 2013, p.15)

Las cenizas solubles son una parte de las cenizas totales que se disuelven en agua, mientras que las cenizas insolubles son el residuo obtenido luego de hacer una disolución con HCl, por lo general éste residuo de cenizas insolubles se compone de sílice y los valores altos del mismo indican contaminación con materia extraña como tierra o arena (Solís et al, 2004, pp.43-91). El

resultado de cenizas solubles en agua fue de 6,98%, mientras que el porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico fue 2,92%, ambos resultados están dentro de los rangos establecidos en la USP 35.

### 3.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es un método de identificación cualitativa de los principales metabolitos presentes en una especie vegetal, con el fin de proporcionar información certera para posteriormente realizar extracciones o fraccionamientos de los diferentes extractos y aislar grupos químicos que sean de interés investigativo (Sharapin, 2000, p.39).

Los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico se observan en la Tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de hojas de *Piper peltatum* L.

ENSAYOS	INDICADORES	TIPO DE EXTRACTO		
		Etéreo	Alcohólico	Acuoso
<b>SUDÁN</b> (Grasas/aceites)	Color rojo (+)	(+)	N/A	N/A
<b>DRAGENDORFF</b> (Alcaloides)	Opalescencia (+)	(+)	(+)	(+)
<b>MAYER</b> (Alcaloides)	Turbidez (++) Precipitado (+++)	(+)	(-)	(+)
<b>WAGNER</b> (Alcaloides)		(++)	(+)	(++)
<b>BALJET</b> (Lactonas-Cumarinas)	Color rojo (++) Precipitado rojo(+++)	(-)	(-)	N/A
<b>BORNTRAGER</b> (Quinonas)	Color rosado (++) Color rojo (+++)	N/A	(-)	N/A
<b>LIEBERMANN- BURCHARD</b> (triterpenos/esteroides)	Rosado-azul Verde intenso visible Verde-oscuro-negro (+)	(+)	(+)	N/A
<b>CATEQUINAS</b>	Mancha verde carmelita (+)	N/A	(-)	N/A
<b>RESINAS</b>	Precipitado (+)	N/A	(+)	N/A
<b>FEHLING</b> (Azúcares Reductores)	Color rojo o precipitado rojo (+)	N/A	(+)	(+)
<b>ESPUMA</b> (Saponinas)	Espuma por más de 2 minutos (+)	N/A	(-)	(-)
<b>CLORURO FÉRRICO</b> (Fenoles/Taninos)	Rojo vino Verde intenso Azul	N/A	(+)	(+)

	Marrón presencia de ácidos alifáticos (+)			
<b>NINHIDRINA</b>		N/A	(-)	N/A
(Aminas/Aminoácidos libres)	Color azul violáceo (+)			
<b>SHINODA</b>	Amarillo, naranja y rojo intensos (presencia de alcohol amílico) (+)	N/A	(+)	(+)
(Flavonoides)				
<b>KEDDE</b>		N/A	(-)	N/A
(Glicósidos cardiotónicos)	Color violáceo (+)			
<b>ANTOCIANIDINAS</b>	Color rojo a marrón en la fase amílica (+)	N/A	(-)	N/A
(Estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides)				
<b>MUCÍLAGOS</b>	Consistencia gelatinosa (+)	N/A	N/A	(-)
(Polisacáridos)				
<b>PRINCIPIOS AMARGOS</b>		N/A	N/A	(-)

---

**Realizado por:** Verónica Ortiz, 2018

En la Tabla 2-3 se observa que existe un considerable conjunto de metabolitos presentes en las hojas de *Piper peltatum* L., se destaca la presencia de flavonoides, fenoles, taninos, azúcares reductores, resinas, triterpenos y esteroides, alcaloides y compuestos grasos. Algunos resultados concuerdan con estudios fitoquímicos realizados con la misma especie, que fue recolectada en la región Amazónica del Ecuador; la variabilidad de éstos se debe a los distintos factores en los que se encuentran las especies, influyen factores climáticos, ambientales, geográficos, etc. (Soto, 2015, pp.105-116).

Otro estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper peltatum* también coincide con los resultados obtenidos anteriormente, pero además en dicho estudio evidenciaron otros metabolitos más como son saponinas, cumarinas, aminas y quinonas (Rivera, 2008, pp.30-43)

El ensayo de Sudán corresponde a la presencia de grasas o aceites que contienen las hojas, el resultado se evidenció con la formación de gotículas rojizas en el extracto etéreo; las pruebas en alcaloides fueron positivas al evidenciar opalescencia y turbidez en los tres tipos de extractos; la prueba de Borntrager determinó la existencia de triterpenos y esteroides al poder observarse una coloración verde-oscuro-negro. Se encontraron también azúcares reductores gracias a la prueba de Fehling donde se logró presenciar precipitados de color rojo; el ensayo de cloruro férrico identificó fenoles dando una coloración verde intensa en el extracto alcohólico, mientras que en el extracto acuoso se evidenció una coloración marrón que indica la existencia de ácidos alifáticos.

Los flavonoides se lograron detectar gracias al ensayo de Shinoda donde se visualizó claramente una coloración naranja y roja intensa.

Los metabolitos identificados atribuyen varias propiedades farmacológicas como antiinflamatorio, diurético, hepatoprotector, etc., en diferentes especies del género *Piper*.

### 3.3. Parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico

En el control de calidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *P. peltatum* L. se evaluaron las características organolépticas y parámetros fisicoquímicos, los resultados se muestran en la Tabla 3-3.

**Tabla 3-3:** Parámetros organolépticos y físico-químicos del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L.

Parámetros	Resultados
Características Organolépticas	<b>Aspecto:</b> Líquido pegajoso <b>Color:</b> Verde Oscuro <b>Olor:</b> Característico alcohólico <b>Sabor:</b> Ligeramente amargo
pH	6,41
Sólidos totales (%)	1,19
Densidad Relativa (g/ml)	0,920
Índice de refracción	1,364

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

La evaluación de drogas consiste en analizar y determinar parámetros como la percepción, físico-químicos y biológicos. La percepción se refiere a la apreciación por medio de los órganos sensoriales como por ejemplo el tamaño, color, olor, aspecto, sabor. Los parámetros físico-químicos permiten determinar la calidad de los extractos que se obtienen de drogas crudas, así como también su estabilidad (Vásquez, 2015, pp.1-5).

En las características organolépticas del extracto se demostró que tiene un aspecto líquido pegajoso, color verde oscuro característico de la clorofila presente en las hojas, el olor característico alcohólico por el disolvente utilizado (etanol 70%) y el sabor ligeramente amargo puede ser producido por la presencia de alcaloides y otros metabolitos que se encuentran presentes en las hojas.



Los parámetros físico-químicos indican un pH ligeramente ácido de 6,41 lo que revela la existencia de una baja cantidad de compuestos ácidos.

Los sólidos totales determinan la cantidad de masa o materia sólida que está disuelta en un líquido por lo que el resultado obtenido fue de 1,19% de sólidos que persisten luego del proceso de vaporización y secado (Espinosa et al., 2013, p.15).

La densidad relativa calculada fue de 0,9201 g/ml que es relativamente mayor en comparación a la densidad relativa del alcohol etílico (0,789 g/ml) lo que indica la existencia de compuestos disueltos, por tanto, la muestra valorada es más densa (Aplicaciones Técnicas Procesos Productivos, 2008, p.1) (Vásquez, 2015, pp.1-5)

Por último, el índice de refracción fue de 1,364 que coincide con el índice de refracción del etanol 1,36 y es un parámetro indicativo de la pureza del extracto (Martínez y González, 2011, p.13).

### 3.4. Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La cuantificación de fenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu, donde se elaboró una curva de calibración de ácido gálico, obteniendo la siguiente ecuación de la recta:  $y = 0,0014x + 0,0144$  con  $R^2 = 0,9997$

Mediante la interpolación de la absorbancia de la muestra en la curva de calibración se obtuvo la concentración de fenoles totales que fueron expresados como miligramos de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto liofilizado, los resultados se muestran en la Tabla 4-3.

**Tabla 4-3:** Resultados de la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico liofilizado de *P. peltatum* L.

<i>Extracto hidroalcohólico liofilizado de P. peltatum L.</i>	<i>Fenoles totales expresados como mg EAG por g de extracto liofilizado</i>	<i>Porcentaje</i>
<i>1000 ppm en etanol al 70%</i>	<i>277,00 ± 3,27</i>	<i>27,70 ± 0,33</i>

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

La concentración de fenoles totales en el extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum* L. fue de 277,00 mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra. Con este resultado se corrobora la presencia de una cantidad considerable de compuestos fenólicos en las hojas de la especie estudiada.

Previos estudios acerca del contenido de fenoles totales presentes en las hojas de *Piper peltatum* afirman que se consiguieron resultados promisorios con muestras no alcohólicas, aplicado el mismo método pero con algunas modificaciones, siendo los resultados de  $138,8 \pm 3,6$  mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra (Puertas et al., 2009, p.1-7).

Otro estudio realizado con el mismo método y usando hojas de plantas del mismo género, pero diferente especie como: *Piper oradendron* y *Piper hispidum*, donde se usó hexano, acetato de etilo y butanol para la cuantificación de fenoles totales, en la especie *P. oradendron* se obtuvieron resultados de 27,83  $\mu\text{g/g}$ ; 19,52  $\mu\text{g/g}$  y 57,29  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente; mientras que en *P. hispidum* los resultados fueron de 28,30  $\mu\text{g/g}$ ; 14,85  $\mu\text{g/g}$  y 62,13  $\mu\text{g/g}$ , en cada uno de los extractos utilizados.

Los resultados obtenidos con el extracto hidroalcohólico son significativamente mayores a los resultados de los estudios antes mencionados, lo que demuestra que la especie contiene grandes cantidades de compuestos fenólicos que pueden ser los responsables de las distintas aplicaciones etnobotánicas como antiinflamatorio, antioxidante, diurético, etc.

### 3.5. Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales del extracto liofilizado de hojas de *P. peltatum* se utilizó un método espectrofotométrico con tricloruro de aluminio, donde el catión aluminio forma complejos estables con los flavonoides para evitar que interfieran otros compuestos fenólicos (Dowd, 1959). La función antioxidante se le atribuye a la presencia de un flavonoide denominado quercetina; éste es incluso 5 veces más potente que otros antioxidantes como son el ácido ascórbico y el tocoferol (Pintado, 2016, p.49).

Los resultados se observan en la Tabla 5-3.

**Tabla 5-3:** Resultados de la cuantificación de flavonoides totales del extracto liofilizado de hojas de *P. peltatum* L.

Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>P. peltatum</i> L.	Flavonoides totales expresados como mg EQ por g de extracto liofilizado	Porcentaje
1000 ppm en etanol al 70%	$86,62 \pm 8,99$	$8,66 \pm 0,90$

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

La cantidad de flavonoides encontrados en el extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum* L. fue de 86,62 mg equivalentes de quercetina por 100 gramos de extracto liofilizado.

Una investigación realizada con hojas de *Piper acutifolium* dio como resultado un valor de 190,80 mg equivalentes de quercetina por mililitro de extracto etanólico al 96 %, el cual es superior al obtenido con el extracto hidroalcohólico de *P. peltatum*; se puede decir que los resultados difieren entre sí por el tipo de solvente utilizado y sobre todo porque son de diferente especie (Pintado, 2016, p.49).

En otro estudio se demostró que las hojas de *P. peltatum* recolectadas en la Región Amazónica, dieron como resultado una cantidad de flavonoides totales de 1,88 g de quercetina por 100 g de hoja seca, aplicando un método descrito por Kostennikova (Soto, 2015, pp.110-112).

La diferencia existente entre los resultados de la cantidad de flavonoides totales de la especie de *P. peltatum* por el método de Kostennikova y por el método aplicado en el presente estudio puede deberse al sitio de recolección de la planta y las condiciones en las que se mantuvo, lo que puede generar diferencias entre los metabolitos presentes en las especies.

### 3.6. Determinación de la capacidad captadora de radicales libres por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6-3

**Tabla 6-3:** Resultados de la determinación de la actividad captadora de radicales libres por método DPPH

Concentración del extracto hidroalcohólico (ppm)	% de Captación de radicales libres
10	7,89
20	9,96
50	10,09
100	10,22
200	11,00
500	18,37
1000	26,13

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

Según los resultados obtenidos sobre el porcentaje de captación de radicales libres a una concentración de 1000 ppm fue de 26,13 % lo que indica que el extracto hidroalcohólico de hojas

de *Piper peltatum* L. no presenta actividad antioxidante significativa a esa concentración, ya que para llegar a un 50 % de captación de radicales libres, se requiere una concentración mucho mayor a 1000 ppm y poder afirmar que el extracto hidroalcohólico presenta actividad antioxidante.

Un estudio realizado con la misma especie muestra resultados de actividad antioxidante apropiada en la fracción 1 del ensayo, obteniendo el resultado más significativo que las demás fracciones evaluadas, en este estudio se usaron varios solventes dentro de los cuales el metanol fue uno de los mejores para la determinación de la actividad antioxidante por dos métodos: DPPH y FRAP (Puertas, et al., 2009, pp.1-4)

### 3.7. Actividad diurética de las hojas de *Piper peltatum* L. en ratas (*Rattus norvegicus*)

El estudio evaluó la actividad diurética del extracto hidroalcohólico liofilizado de *Piper peltatum* L. sobre *Rattus norvegicus*. Los resultados obtenidos después de 6 horas de la administración de los tratamientos se encuentran en la Tabla 7-3.

**Tabla 7-3:** Efecto de las hojas de *Piper peltatum* L. sobre el volumen de orina excretado por ratas de laboratorio durante 6 horas.

GRUPOS	Dosis administradas	Volumen total de orina (ml)	Acción Diurética	Actividad Diurética
CMC 0,9%	5 ml/g	1,05 ± 0,07	1	-
Furosemida	10 mg/kg	3,24 ± 0,42	2,81	1
EHL <i>P.peltatum</i>	25 mg/kg	1,5 ± 0,16	1,43	0,51
EHL <i>P.peltatum</i>	100 mg/kg	2,3 ± 0,41	2,43	0,86
EHL <i>P.peltatum</i>	200 mg/kg	0,67 ± 0,08	0,71	0,25

EHL: extracto hidroalcohólico liofilizado; CMC: carboximetilcelulosa  
 Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

La vía de administración oral es la más habitual; por ello se empleó esta forma de dosificación al ser una manera cómoda de ingerir un medicamento; para la comparación del efecto se usó como control positivo un diurético de la familia de las sulfonamidas como es la furosemida, conocido como un diurético de asa o alto techo.

Antes de los tratamientos se administró a los animales de experimentación una carga uniforme de solución salina, para igualar el nivel de hidratación y electrolitos, produciendo así un alto efecto de eliminación de solutos y simular la formación de edema (Fernández et al., 2008, pp.1-6).

Luego de la administración de las 3 dosis del extracto (25mg, 100mg y 200mg) se observa que existen diferencias en cuanto al volumen de orina excretado con respecto al control positivo (furosemida), sin embargo, las dosis de 25 mg y 200 mg no tuvieron una acción y actividad diurética significativa, esto puede ocurrir porque el extracto está compuesto por diferentes sustancias, donde pudiera haber interferencia entre los componentes a estas dosis provocando así obstáculos en la absorción, distribución o unión a receptores de los componentes activos; mientras que la dosis de 100 mg tiene actividad casi similar al control positivo (Nedi et al., 2004, pp.60-61).

En la Tabla 8-3 se muestra el volumen de orina excretado en cada hora según los tratamientos administrados.

**Tabla 8-3:** Volumen de excreción por hora en cada uno de los tratamientos administrados.

<b>Tratamientos</b>	<b>1° Hora</b>	<b>2° Hora</b>	<b>3° Hora</b>	<b>4° Hora</b>	<b>5° Hora</b>	<b>6° Hora</b>	<b>Volumen Total</b>
<b>Control negativo (CMC 0,9%)</b>	0,2±0,14	0,15±0,07	0,25±0,07	0,3±0,14	0,1±0,14	0,05±0,07	1,05±0,07
<b>Furosemida (10mg/kg)</b>	1,3±0,42	0,72±0,58	0,52±0,54	0,2±0,23	0,1±0,14	0,4±0,23	3,24±1,10
<b>EHL (25mg/kg)</b>	0,10±0,10	0,33±0,31	0,77±1,07	0,13±0,06	0,03±0,06	0,13±0,23	1,5±0,66
<b>EHL (100mg/kg)</b>	0,0 ± 0,0	0,10±0,20	1,10±1,19	0,45±0,66	0,55±1,10	0,10±0,12	2,30±0,42
<b>EHL (200mg/kg)</b>	0,23±0,15	0,27±0,31	0,10±0,10	0,0±0,0	0,07±0,12	0,0±0,0	0,67±0,61

CMC: carboximetilcelulosa; EHL: extracto hidroalcohólico liofilizado  
 Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

La furosemida ejerce un efecto diurético instantáneo en la primera hora, mientras que en los otros tratamientos no se muestra efecto inmediato sino a partir de la tercera hora, por lo que se consideraría compararlos con el efecto de los diuréticos tiazídicos, los cuales presentan el inicio de su acción a partir de la segunda hora alcanzando su concentración máxima a la tercera hora (Ficha técnica Hidrosaluretil, 2006, pp.60-63).

Los diuréticos de asa poseen acción inmediata en los primeros 30 min o la primera hora luego de su administración, pero al alcanzar su techo de acción no producen más diuresis aunque se incremente la dosis (Teresa, 2007, p.1)

Las diferencias entre los volúmenes excretados tanto en el control de furosemida como en los distintos tratamientos del extracto administrado y el tiempo en el que se presencia su aumento podría deberse a factores relacionados con la farmacocinética o farmacodinámica de los metabolitos presentes en la planta (Ramírez et al., 2006, pp.145-148).

### 3.8. Electrolitos urinarios

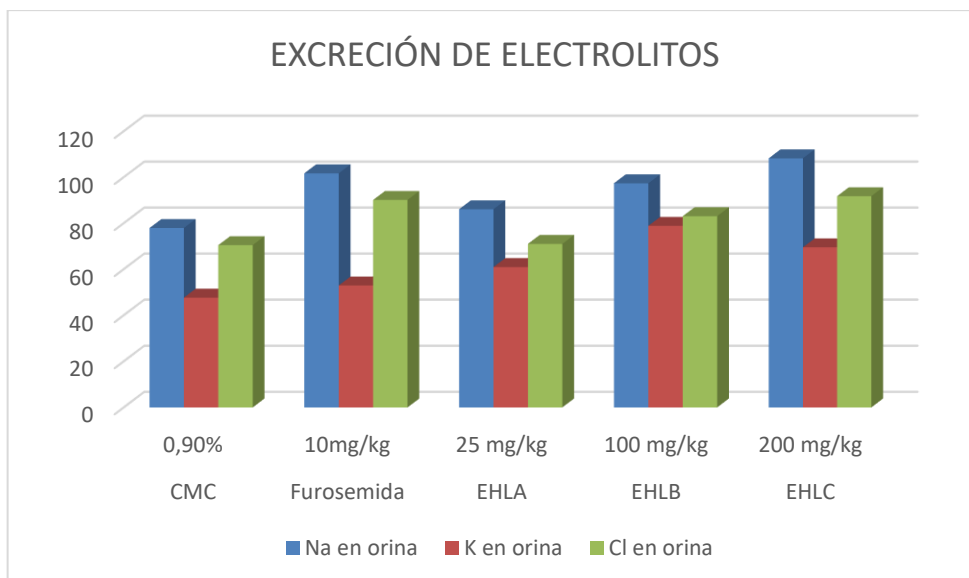
En la Tabla 9-3 se observan datos de excreción de los electrolitos sodio, potasio y cloro de acuerdo a los tratamientos aplicados en los animales de experimentación. Los diuréticos generan en su mayoría hipokalemia, considerada como un efecto adverso frecuente en el uso de este tipo de fármacos (Goodman y Gilman, 2012, p.667).

**Tabla 9-3:** Excreción de electrolitos según la administración de las dosis del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L.

Tratamiento	Dosis	Na <sup>+</sup> en orina (mmol/L)	K <sup>+</sup> en orina (mmol/L)	Cl <sup>-</sup> en orina (mmol/L)	Na <sup>+</sup> index	K <sup>+</sup> Index	Cl <sup>-</sup> index
CMC	0,9%	77,9±10,32	47,65±5,87	70,45±4,17	1	1	1
Furosemida	10mg/kg	101,68±8,62	52,92±7,12	90,10±6,13	1,31	1,11	1,28
EHL <i>P.peltatum</i>	25 mg/kg	86,07±19,90	60,93±4,10	71,00±22,94	1,10	1,28	1,01
EHL <i>P.peltatum</i>	100 mg/kg	97,35±24,63	78,85±17,69	83,05±27,74	1,25	1,65	1,18
EHL <i>P.peltatum</i>	200 mg/kg	108,20±34,79	69,50±22,49	91,75±24,11	1,39	1,46	1,30

CMC: carboximetilcelulosa; EHL: extracto hidroalcohólico liofilizado; index: excreción en el grupo de ensayo/excreción en el grupo control

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018



**Gráfico 1-3: Excreción de electrolitos según los tratamientos administrados**  
 Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

Por lo general los diuréticos, exceptuando los ahorradores de potasio, inhiben la reabsorción de sodio y agua, aumentando su cantidad en el túbulo distal donde la secreción de potasio dependerá del aporte de sodio (Shinkawa, 1993, p.323).

En la tabla 9-3 y gráfico 1-3, se muestra la excreción de electrolitos, donde los tres tratamientos de 25, 100 y 200 mg/kg no muestran diferencia estadística significativa en la excreción de sodio y cloro con respecto al vehículo y a la furosemida; sin embargo, con una dosis de 100 mg/kg, la excreción de potasio es significativamente diferente (Ver Anexo L), siendo mayor que ambos controles, lo que indicaría que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L. a esa concentración, actúa de manera similar a un diurético tiazídico, tanto en el inicio de acción, como se observa en la tabla 8-3, así como también en la eliminación de electrolitos, aunque se requieren estudios más profundos para determinar con precisión el mecanismo de acción (Brunton et al., 2012, pp.687-690).

Sin embargo, las tiazidas pueden actuar de forma paradójica reduciendo el volumen urinario; además, ocasionan hiperosmolaridad urinaria mediante el incremento de la reabsorción de agua en el túbulo proximal y el bloqueo de la capacidad del túbulo contorneado distal para formar orina diluida (Brunton et al., 2012, pp.687-690).

**Tabla 10-3:** Efecto salurético y natriurético del extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L. sobre ratas de laboratorio.

GRUPOS	DOSIS	Efecto Salurético	Efecto Natriurético	Salurético index	Natriurético index
CMC	0,9%	148,35±14,50	1,66±0,42	1	1
Furosemida	10 mg/kg	191,78±14,35	1,96±0,39	1,29	1,18
EHL	25 mg/kg	157,07±42,43	1,4±0,23	1,06	0,84
<i>P.peltatum</i>					
EHL	100 mg/kg	180,4±52,27	1,25±0,22	1,22	0,75
<i>P.peltatum</i>					
EHL	200 mg/kg	199,95±58,90	1,56±0,00	1,35	0,94
<i>P.peltatum</i>					

CMC: carboximetilcelulosa; EHL: extracto hidroalcohólico liofilizado; index: excreción en el grupo de ensayo/excreción en el grupo control

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

El efecto salurético que provocó la administración de las concentraciones de 25 mg y 100 mg es menor comparado con el efecto del fármaco estándar pero no muestran diferencias significativas, se podría comparar con el efecto salurético bajo que provocan las tiazidas con relación a los diuréticos de asa.

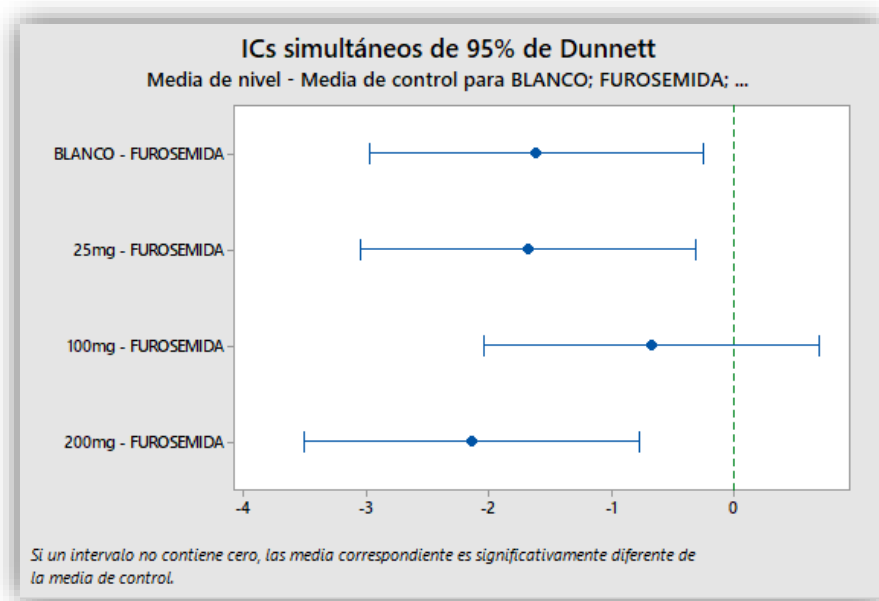
El fármaco de referencia, aumenta la producción de orina y la excreción urinaria de sodio mediante la inhibición del cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  en la porción cortical y medular de la rama gruesa ascendente del asa de Henle, mientras que los diuréticos tiazídicos inhiben el cotransportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  en el túbulo contorneado distal, compitiendo por el sitio de unión de  $\text{Cl}^-$  y aumentando la excreción de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Lahlou et al., 2007, pp.458-460).

El efecto natriurético del fármaco de referencia fue de 1,96 mientras que los efectos de las 3 dosis administradas son menores a este valor. Este efecto se obtuvo de la relación entre los valores de sodio y potasio presentes en la orina recolectada. Es importante aclarar que en un diurético de tipo asa la relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  tiene un valor cercano a 1, en las tiazidas esta relación es menor a 1 y en los diuréticos ahorradores de potasio es mayor a 1 (Fernández et al. 2008, pp.1-6).

En un estudio de actividad diurética de *Carum carvi* y *Tanacetum vulgare*, se evidenció que el cociente de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la furosemida fue de 2,51 y para la hidroclototiazida 3,62; por lo que los resultados obtenidos en el efecto natriurético del presente estudio se encuentran por debajo incluso de estos valores (Lahlou et al., 2007, pp.458-460).



### 3.9. Análisis estadístico



**Gráfico 2-3: Test DUNNETT**

Realizado por: Verónica Ortiz, 2018

Los resultados de la investigación acerca de la actividad diurética se analizaron con el programa estadístico Minitab 17, con un diseño aleatorio de un factor (dosis) y una variable respuesta (excreción urinaria)

Se aplicó el test ANOVA de un solo factor siendo el resultado de  $p=0,003$  por lo que se aceptó la hipótesis alternativa con  $p<0,05$ ; lo cual significa que por lo menos una de las medias es significativamente diferente (Ver ANEXO K).

Cuando se aceptó la hipótesis alternativa se recurrió al uso del test DUNNET para determinar qué dosis es similar o diferente al control positivo (furosemida). El resultado fue que la dosis de 100 mg es similar a la furosemida lo que indica que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L. presenta actividad diurética a esa concentración.

Los metabolitos implicados en la actividad diurética que se encuentran en la especie vegetal son principalmente los flavonoides ya que éstos actúan en el glomérulo ocasionando el aumento de la circulación renal y un incremento en la tasa de filtración glomerular para la formación de orina primaria (Bastidas et al., 2016, pp.16-17).

## CONCLUSIONES

Se determinó que el material vegetal cumple con los parámetros de calidad establecidos, por lo que fue apta para el desarrollo de la presente investigación. Gracias al tamizaje fitoquímico, se identificaron compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos, esteroides, azúcares reductores, etc., responsables de los diferentes usos que se le atribuyen a la especie vegetal.

Se cuantificó mediante técnicas colorimétricas el contenido de fenoles y flavonoides presentes en el extracto, cuyos resultados fueron  $277,00 \pm 3,27$  mg de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto liofilizado y  $86,62 \pm 8,99$  mg de quercetina por cada 100 gramos de extracto liofilizado respectivamente.

Se determinó la actividad antioxidante por el método DPPH, donde la capacidad de captación de radicales libres máxima fue de 26,13 %, lo que significa que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Piper peltatum* L., no presenta actividad antioxidante significativa a una concentración de 1000 ppm.

La dosis de 100 mg del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Piper peltatum*, presentó una actividad diurética significativamente similar al fármaco de referencia utilizado (furosemida).

Se evidenció que, en la excreción de electrolitos, a una dosis de 100 mg/kg el ion potasio se elimina en mayor cantidad con relación a los controles furosemida y el vehículo, por lo cual sería idóneo que, al utilizar este extracto como diurético, se complemente la dieta con productos que contengan cantidades significativas de potasio o usar diuréticos ahorradores de potasio para evitar grandes pérdidas y sobre todo reducir el riesgo de hipokalemia.

## **RECOMENDACIONES**

Se requieren investigaciones más completas para determinar con exactitud los metabolitos presentes en la especie vegetal *Piper peltatum* L., y si es posible aislarlos para conocer cuáles son los responsables de la actividad diurética y comprender de mejor manera el mecanismo de acción.

Es recomendable utilizar otros tipos de solventes para conocer cuál de ellos presenta mejores resultados en cuanto al efecto diurético.

Se propone realizar análisis toxicológicos y genotoxicológicos con el fin de conocer posibles riesgos que pudiera ocasionar el consumo de este extracto a diferentes dosis o con su uso prolongado.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**ABREU, O; & MORGADO, M.** “Farmacognosia, farmacobotanica, farmacogeografía y farmacoetimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*)”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2012, vol. 87, pp. 145-156

**ANSARI, M.; et al.** “Evaluation of the diuretic and urinary electrolyte effects of methanolic extract of *Peganum harmala* L. in Wistar albino rats” *Science direct*, [en línea], 2016, pp. 1-5. [Consulta: 10 agosto 2018]. Disponible en: DOI 10.1016/j.sjbs.2016.01.025.

**ARMAS, M.; & HERNÁNDEZ, R.** "Uso de diuréticos en la hipertensión". *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, vol. 1, no. 1, (2006), pp. 12-14

**BAQUERO, E.; et al.** "Actividad antimicrobacteriana de algunas plantas de la flora colombiana" *A Scientia et Technica* [en línea], 2007, Vol. 1 (no. 33), pp. 133-136. [Consulta: 23 julio 2018]. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6157>

**BENÍTEZ, N.** Actividad antibacteriana a partir de extractos de hojas de seis especies del género *Piper* L. (Piperaceae). *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó*, 2008, vol. 27, (no. 1), pp. 67-75.

**BOTTIA E.; et al.** "Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación–extracción simultánea" Centro de Investigación en Biomoléculas – CIBIMOL y Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, *Revista Scientia et Technica* [en línea], 2007, Vol. 1, (no 33), pp. 45-57, [Consulta: 23 julio 2018]. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6157>

**BOUAZIZ, M.; et al.** "Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves", *Science direct* [en línea], 2010, pp. 894-905. [Consulta: 23 julio 2018]. Disponible en: DOI 10.1002/ejlt.200900166.

**BOUKHRIS, M.; et al.** "Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium , *Pelargonium graveolens*", 2012, pp.267-283

**BRAGULAT, E.; & ANTONIO, M.** "Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial: fármacos antihipertensivos". *Medicina Integral*, [en línea], 2001 vol. 37, no. 5, pp. 215-221. ISSN 0210-9433. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-hipertension-arterial-prevencion-tratamiento-13782>

**BREITBACH, U.; et al.** "Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century", *Journal of Ethnopharmacology*, [en línea], 2013, vol. 147, no. 1, pp. 180-189. [Consulta: 20 agosto 2018] ISSN 1872-7573. Disponible en: DOI 10.1016/j.jep.2013.02.030.

**CHEN, D.; et al.** "Diuretic and anti-diuretic activities of fractions of *Alismatis rhizoma*", *Journal of Ethnopharmacology*, [en línea], 2014, vol. 157, pp. 114-118. [Consulta: 20 agosto 2018] ISSN 03788741. Disponible en: DOI 10.1016/j.jep.2014.09.022.

**COCA, A.** "Conocimiento y actitudes sobre la evaluación clínica y el tratamiento de la hipertensión arterial resistente: Estudio RESIST". *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 2017, vol. 34, no. 1, pp. 4-16. ISSN 1889-1837. [Consulta: 20 agosto 2018], Disponible en: DOI 10.1016/j.hipert.2016.07.001.

**CUELLAR A.** "Resumen de los métodos utilizados para el análisis de calidad de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos". Universidad de la Habana, 2013, pp. 15-20

**DELGADO, G.; KATO, M.; & ROJAS, C.** "Suspensiones celulares y producción de metabolitos secundarios en cultivos in vitro de *Piper sp*". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2013, vol. 12, no. 3, pp. 269-282.  
*Densidad y peso específico* [en línea]. S.l.: s.n. [Consulta: 24 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.atpplleal.com/userfiles/files/densidad-y-peso-especifico.pdf>.

**DESMARCHELIER, C.; GURNI, A.; CICCIA, G.; & GIULIETTI, A.** "Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest", *Journal of Ethnopharmacology*, 1996, vol. 52, no. 1, pp. 45-51. ISSN 0378-8741.

**DESMARCHELIER, C.; SLOWING, K.; & CICCIA, G.** "Anti-inflammatory activity of *Pothomorphe peltata* leaf methanol extract", *Fitoterapia*, 2000, vol. 71, no. 5, pp. 556-558. ISSN 0367326X. DOI 10.1016/S0367-326X(00)00166-0.

*Encuesta Nacional de Salud y Nutrición: ENSANUT-ECU 2012*. Quito: INEC. 2014, ISBN 978-9942-07-659-5.

**OLIVERO, D.** "Efecto diurético de Peperomia pellucida en ratas Wistar" *Revista Información Científica*. [en línea], 2015. pp. 13-15 [Consulta: 2 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/1238/2495>.

**DE LA TORRE, H.; et al.** "Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador", Herbario QCA & Herbario AAU. Quito: Aarhus, 2008, p.113

**FERNÁNDEZ, P.L.** "Velázquez. Farmacología Básica y Clínica" [en línea]. S.l.: Ed. Médica Panamericana., 2017, pp.12-15

**FERNÁNDEZ, G.; SÁNCHEZ, B.; & ARIAS, M.** "Diuréticos: clasificación y farmacología clínica. Efectos secundarios. Indicaciones prácticas para su empleo clínico", *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, [en línea], 2003 vol. 8, no. 112, pp. 5998-6008. [Consulta 2 agosto 2018] ISSN 03045412. Disponible en: DOI 10.1016/S0304-5412(03)71105-6.

*Ficha técnica Hidrosaluretil. Prospecto Hidrosaluretil.* [en línea], Bogotá, 2006, 10ª actualización (11/12/06), pp. 60-63 Disponible en: <https://www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Documents/232/HIDROCLOROTIAZIDA.pdf>

**GUSTAFSON, K.R.; et al.** "The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from Pothomorphe peltata." *Journal Organic Chemistry*, 1992, vol. 57, (n. 10), pp. 2809-2811

**HABIB, N.; DAUD, A. & SÁNCHEZ, A.** "Efecto diurético de extractos acuosos y alcohólicos de flores de Phrygilanthus acutifolius (corpo) en ratas", *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2005, vol. 10, (no. 3-4), pp. 1-16

**HANAN, A.; & MONDRAGÓN, J.** "Malezas de México". México, 2009, [Consultada 13 agosto 2018]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/piperaceae/piper-umbellatum/fichas/ficha.htm>

**HARBORNE, J.** "General procedures and measurements of total phenolics". In: Harborne J .B, Londres, Ed. Plant Phenolics, 1989, vol 1, pp.1-28

**HERMOSILLA, R.; et al.** "Estudio fitoquímico y control de calidad de extractos de hojas de *Rheedia aristata* Griseb", *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2013, vol. 18, no. 3, pp. 361-367

*HIV inhibitory natural products. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivatives from *Pothomorphe peltata**. [en línea], 2018. pp.1-6, [Consulta: 31 julio 2018], Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jo00036a010>.

*Pan American Health Organization / World Health Organization* [en línea]. 2013, [Consulta: 3 julio 2018]. Disponible en: [http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1072:noviembre-20-2013&Itemid=972](http://www.paho.org/ecu/index.php?option=com_content&view=article&id=1072:noviembre-20-2013&Itemid=972).

**ISEA, G.; et al.** "Efecto diurético del extracto acuoso de pericarpio de melón (*Cucumis melo* L. variedad *reticulatus* Naud) en ratas". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2008, vol. 13, (no. 2), pp. 3-16

**JARILLO, J.** "Mecanismo de acción de los diuréticos", 2016, pp. 24-32.

**JIMENEZ I.; & LOPEZ I.** "Metabolitos Secundarios Biactivos de Especies del Genero Piper de la Flora Boliviana", *Ciencia y Tecnologia.*, Universidad de La Laguna, 2006, pp. 23-37

**JORGENSEN, P.; & LEÓN, S.** "Catálogo de Plantas Vasculares del Ecuador", San Louis. Botanical Garden Missouri.1999, p.34

**LAHLOU, S.; TAHRAOUI, A.; ISRAILI, Z.; & LYOUSSI, B.** "Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats". *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, vol. 110, no. 3, pp. 458-463. [Consultado: 10 agosto 2018], Disponible en: DOI 10.1016/j.jep.2006.10.005.

*Lista de Plantas Medicinales del Ecuador, ForosEcuador.ec* [en línea], 2017. [Consulta: 30 septiembre 2018]. Disponible en: <http://www.forosecuador.ec/forum/aficiones/salud/117954-lista-de-plantas-medicinales-del-ecuador-y-para-que-sirven>.

**LOZANO, J.A.** "Hipertensión arterial. Prevención y tratamiento". *Offarm*, 2001, vol. 20, no. 2, pp. 75-87

**MARTÍNEZ, M.; REINA, M. & GONZÁLEZ, A.** "Índices de refracción, densidades y propiedades derivadas de mezclas binarias de solventes hidroxílicos", *Revista Colombiana de Química*, 2011, vol. 40, no. 2, pp. 247-268.

**MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G.** "Investigation of the larvicidal activity of *Pothomorphe peltata* and isolation of the active constituent". *Phytotherapy Research*, 2002, vol. 16, suppl. 1, p. 71-72, [Consultado: 27 septiembre 2018], Disponible en: <http://www.sbpmed.org.br/download/issn245.pdf>

**MONGELLI, E.; et al.** "Antioxidant compound 4-nerolidylcatechol inhibits in vitro KB cell growth and topoisomerase I activity", *Revista Society Chemical*, [en línea], 1999, pp. 404-406. [Consultado: 27 septiembre 2018], Disponible en: [http://www.sbpmed.org.br/download/issn\\_06\\_4/8esp\\_205\\_211.pdf](http://www.sbpmed.org.br/download/issn_06_4/8esp_205_211.pdf)

**MORALES, F.J.** "Papel actual de los diuréticos en el tratamiento de la hipertensión arterial", *Hipertensión y Riesgo Vascular*, [en línea], 2008, vol. 25, (no. 5), pp. 198-204. [Consultado: 27 septiembre 2018] ISSN 1889-1837. Disponible en: DOI 10.1016/S1889-1837(08)71764-1.

**MORALES, F.J.** "Diferencias y similitudes entre diuréticos", *Hipertensión y Riesgo Vascular*, 2013, vol. 30, pp. 13-19. [Consultado: 27 septiembre 2018], ISSN 18891837. Disponible en: DOI 10.1016/S1889-1837(13)70021-7.

**NEDI, T.; MEKONNEN, N; & URGA, K.** "Diuretic effect of the crude extracts of *Carissa edulis* in rats", *Journal of Ethnopharmacology*, [en línea], 2014, vol. 95, no. 1, pp. 57-61. [Consultado: 27 septiembre 2018] ISSN 03788741. Disponible en: DOI 10.1016/j.jep.2004.06.017.

**NÚÑEZ, V.; et al.** "Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle", *Phytochemistry*, [en línea], 2005, vol. 66, no. 9, pp. 1017-1025, [Consultado: 12 septiembre 2018] ISSN 0031-9422. Disponible en: DOI 10.1016/j.phytochem.2005.03.026.

**OMS.** Hipertensión. *WHO* [en línea], 2017. [Consulta: 14 octubre 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/hypertension/es/>.



**PARMAR, V.S.; et al.** "Phytochemistry of the genus Piper", *Phytochemistry*, [en línea], 1997 vol. 46, no. 4, pp. 597-673. [Consultado: 12 septiembre 2018] ISSN 0031-9422. Disponible en: DOI 10.1016/S0031-9422(97)00328-2.

**PEÑARRIETA, J.** "Phenolic compounds in food", *Revista boliviana de química*, 2013, vol. 31, pp. 15.

**PÉREZ MACHÍN, M.; et al.** "Validación de un método in vivo para evaluar la actividad diurética", *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, [en línea], 2012, vol. 30, (no. 3), pp. 332-344. [Consultado: 2 octubre 2018], ISSN 0864-0300. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-Py\\_o3jsEHxQ1QUz7cwIdPLo-1Ih6RRfS48](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-Py_o3jsEHxQ1QUz7cwIdPLo-1Ih6RRfS48)

**PESCIO, S.** "Tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial." *Medwave* [en línea], 2001, vol. 1, (no. 02). [Consulta: 24 septiembre 2018]. ISSN 0717-6384. DOI 10.5867/medwave.2001.02.1908. Disponible en: </link.cgi/Medwave/PuestaDia/APS/1908>.

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

**PINTADO, L., & SÁNCHEZ, M.** "Efecto del extracto etanólico de las hojas de piper acutifolium, procedentes de Coina, distrito de Usquil, en la oxidación de LDL humana, in vitro". Universidad Nacional de Trujillo, 2015, pp.49-56. [Consulta: 4 octubre 2018]. Disponible en: <dspace.unitru.edu.pe>

**PONZ, E.** "La Medicina Tradicional de los Tacana y Machineri", ed. F. PIEB. 2005, La Paz Bolivia. pp.14-15

**PORRAS, A et al.** "Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos". San Andrés Cholula, México. 2009 pp.121-134 [Consulta: 4 octubre 2018]. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)

**PUCE, H.Q.** Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador, 2017, vol. 1, pp. 322.

**PUERTAS, M.; GÓMEZ, L.; ROJANO, B.; & SÁEZ, J.** "Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, [en línea], 2009, vol. 14, (no. 2), pp. 1-9. ISSN 1028-4796. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962015000200003&fbclid=IwAR1divsVn0rVoYM6JbkzAgzEkPeGvQekaQUIG5-yR8fQfd7Lp9xgT9xmvo0](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000200003&fbclid=IwAR1divsVn0rVoYM6JbkzAgzEkPeGvQekaQUIG5-yR8fQfd7Lp9xgT9xmvo0)

**RAMÍREZ, J.; PALACIOS, M.; & GUTIÉRREZ, O.** "Efecto diurético de la especie *Salvia scutellarioides* en ratas". *Biomédica*, [en línea], 2006 vol. 26, no. 1, pp. 145. [Consulta: 3 octubre 2018], ISSN 0120-4157. Disponible en: DOI 10.7705/biomedica.v26i1.1403.

**RIVERA, R.** "Caracterización de aceites esenciales por cromatografía de gases de tres especies del género *Piper* y evaluación de la actividad citotóxica", 2008. Guatemala. pp.30-43.

**SHAHIDI, F.; & NACZK, M.** "Phenolics in food and nutraceuticals", CRC Press. Londres. 2004, pp. 1-16

**SHARAPIN, N.** *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. S.l.: Convenio Andrés Bello. 2000. pp. 13-15. [Consulta: 4 agosto 2018], ISBN 978-958-698-001-2. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/132874-Piper-peltatum>

**SOLIS, P.; GUERRERO, N.; & GATTUSO, M.** "Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos", 2004, pp. 43-91.

**SOTO, M.** *Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas*, [en línea], 2015. pp.105-116. [Consulta: 29 septiembre 2018]. Disponible en <file:///C:/Users/WinUser/Downloads/EstudiofitoquimicoycuantificacindeflavonoidestotalesdePiperpeltatumL.yPiperaduncumL..pdf>

**TEBBS, M.C.** "Revision of *Piper* (Piperaceae) in the New World 3. The taxonomy of *Piper* sections *Lepianthes* and *Radula*". *Bulletin of the Natural History Museum*. [en línea], 1993, vol. 23, pp. 2-51. [Consulta: 20 septiembre 2018] ISSN 0968-0446. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/taxa/132874-Piper-peltatum>

**TORRES, N.** *Calidad farmacoterapéutica*. Valencia, Universitat de València. 2006, pp. 13-23

**VÁSQUEZ, M.** "Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedentes de la región Amazonas". *In Crescendo*, 2015, vol. 6, (no. 1), pp. 105-116. [Consulta: 29 septiembre 2018], ISSN 2307-5260, 2222-3061. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/279516871\\_Estudio\\_fitoquimico\\_y\\_cuantificacion\\_de\\_flavonoides\\_totales\\_de\\_las\\_hojas\\_de\\_Piper\\_peltatum\\_L\\_y\\_Piper\\_aduncum\\_L\\_procedentes\\_de\\_la\\_region\\_Amazonas](https://www.researchgate.net/publication/279516871_Estudio_fitoquimico_y_cuantificacion_de_flavonoides_totales_de_las_hojas_de_Piper_peltatum_L_y_Piper_aduncum_L_procedentes_de_la_region_Amazonas)

**ZUANY, C.; et al.** Screening for antimalarial activity in the Genus Pothomorphe. *Journal of ethnopharmacology*, [en línea], 1988, vol. 24, pp. 101-6. [Consulta: 30 agosto 2018], Disponible en: DOI 10.1016/0378-8741(88)90140-7.

## ANEXOS

### ANEXO A. Hojas de *Piper peltatum* L. recolectadas



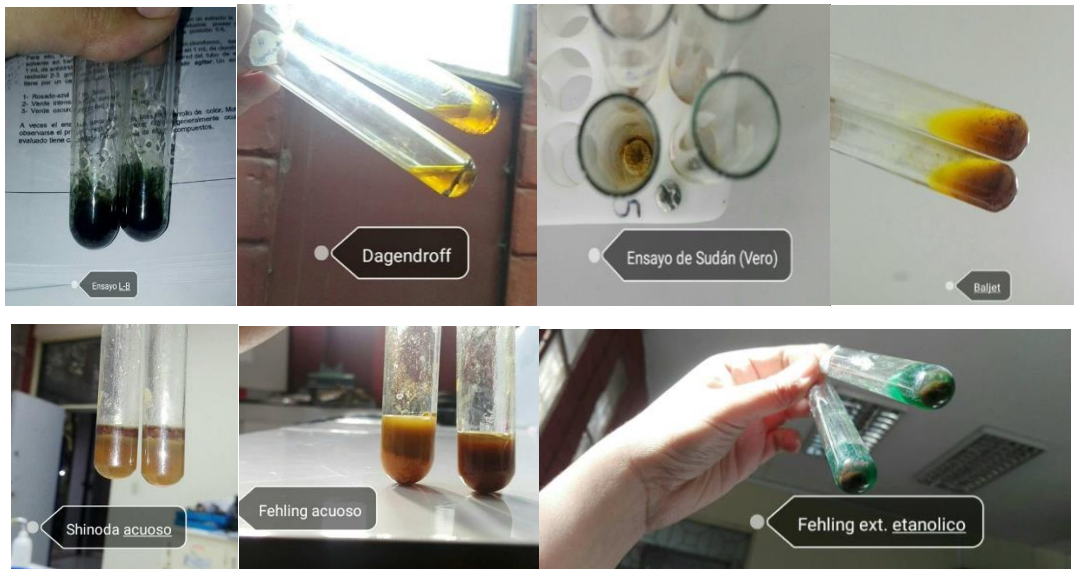
### ANEXO B. Control de calidad del material vegetal



### ANEXO C. Control de calidad del extracto hidroalcohólico



## ANEXO D. Tamizaje fitoquímico



## ANEXO E. Liofilización del extracto



## ANEXO F. Cuantificación de flavonoides totales



**ANEXO G.** Animales de experimentación (*Rattus norvegicus*)



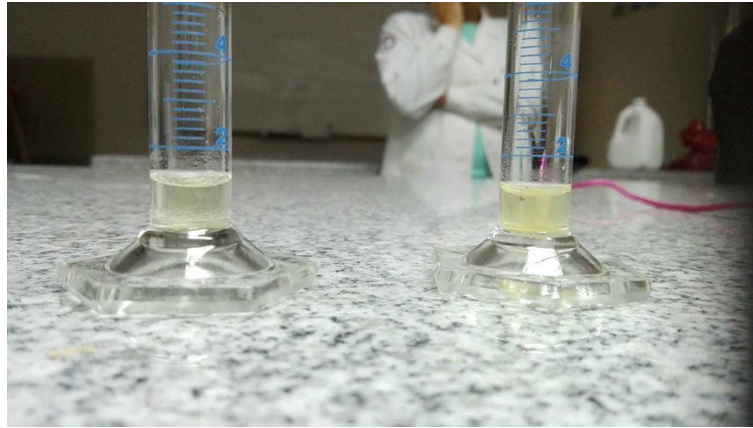
**ANEXO H.** Administración de los tratamientos



**ANEXO I.** Equipo para actividad diurética



## ANEXO J. Volúmenes de orina recolectados durante 6 horas



## ANEXO K. Test estadístico ANOVA

### ANOVA unidireccional: BLANCO; FUROSEMIDA; 25mg; 100mg; 200mg

#### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        Por lo menos una media es diferente  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	5	BLANCO; FUROSEMIDA; 25mg; 100mg; 200mg

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	15,01	3,7516	5,65	0,003
Error	20	13,28	0,6638		
Total	24	28,28			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,814710	53,06%	43,67%	26,66%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BLANCO	5	1,000	0,000	( 0,240; 1,760)
FUROSEMIDA	5	2,616	0,799	( 1,856; 3,376)
25mg	5	0,936	0,980	( 0,176; 1,696)
100mg	5	1,942	1,152	( 1,182; 2,702)
200mg	5	0,476	0,628	(-0,284; 1,236)

Desv.Est. agrupada = 0,814710

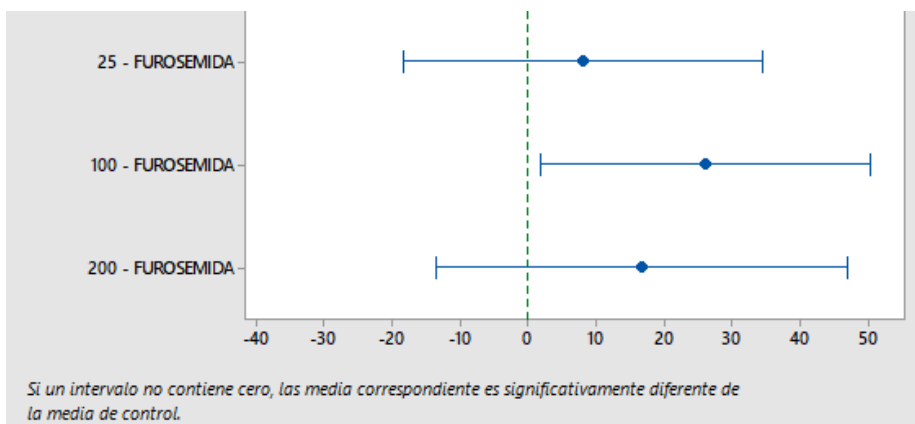
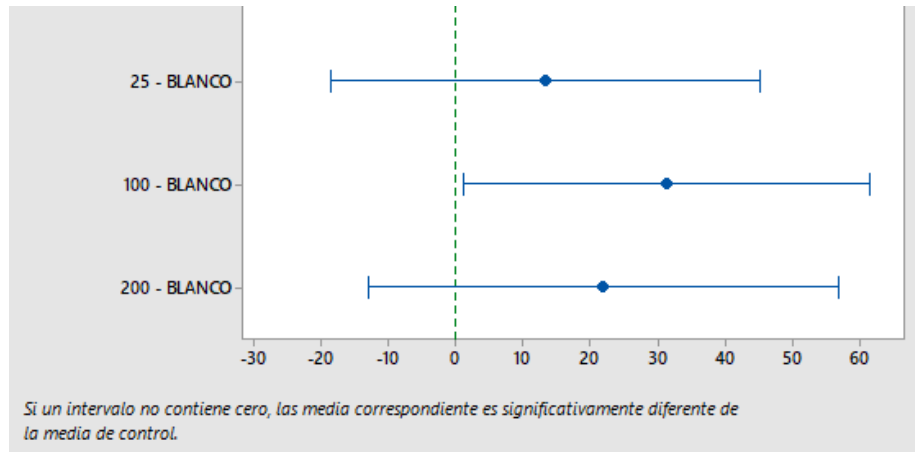
#### Comparaciones múltiples de Dunnet con un control

Agrupar información utilizando el método de Dunnett y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
FUROSEMIDA (control)	5	2,616	A
100mg	5	1,942	A
BLANCO	5	1,000	
25mg	5	0,936	
200mg	5	0,476	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

**ANEXO L.** Test Dunnet sobre la excreción de potasio con respecto al control blanco y a la furosemina.





MINISTERIO DEL AMBIENTE



Oficio Nro. MAE-DNB-2018-0865-O

Quito, D.M., 17 de septiembre de 2018

**Asunto:** Entrega de Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos asignado con el Nro. MAE-DNB-CM-2018-0086.

Señor Ingeniero  
Byron Ernesto Vaca Barahona  
**Rector**  
**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO- ESPOCH**  
En su Despacho

De mi consideración:

Para su conocimiento y fines pertinentes adjunto sírvase encontrar dos (2) copias del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del programa de investigación científica denominado: "**ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE**", que consta en el Registro Público de Solicitantes con el código Nro. MAE-DNB-CM-2018-0086 de 30 de agosto de 2018, e inscrito en esta Cartera de Estado bajo el número 6367 folio 402 de 14 de septiembre de 2018, celebrado entre el Ministerio del Ambiente a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural; y, la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,

Ing. David Alejandro Veintimilla Yáñez  
**DIRECTOR NACIONAL DE BIODIVERSIDAD, ENCARGADO**

Anexos:  
- mae-dnb-cm-2018-0086.pdf

Copia:  
Licenciada  
Karen Liseth Acosta León  
  
Señora Abogada  
Vanessa Patricia Solis Mora  
**Abogada 1**  
  
Señora Tecnóloga  
Janneth del Rocío Astudillo Cabezas  
**Secretaría de Dirección**

SECRETARIA GENERAL

Ministerio  
del Ambiente  
FECHA REG 14 SEP 2018



REGISTRO 636.7  
FOLIO 402

MINISTERIO DEL AMBIENTE



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

MAE-DNB-CM-2018-0086

**COMPARECIENTES:**

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

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

**PRIMERA. ANTECEDENTES.-**

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

**DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO**

**PATENTE ANUAL DE FUNCIONAMIENTO DE CTMVS**

**NRO: 01-2018-DPACH-UPN-CTMVS- HERBARIO**

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, confiere a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), representado por el Ing. Byron Vaca Barahona PhD, en calidad de RECTOR, la patente respectiva para el manejo de especímenes de Flora Silvestre, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

**1. Documentación habilitante:**

1.1 Solicitud del Ing. Luis Fiallos Ortega Rector (E) de la ESPOCH dirigida al Ing. Marcelo Pino Director Provincial del Ambiente de Chimborazo mediante Oficio Nro.0475.R.ESPOCH.2018, con fecha 12/03/2018.

1.2 Informe anual de actividades realizadas en el año 2017, elaborado por el Ing. Jorge Caranqui Responsable del Herbario, entregado al Rectorado con Oficio Nro. 009-CHEP-2017, de fecha 7/03/2018.

1.3 Informe técnico Nro. 042-2018-VS-MDA-UPN-DPACH, elaborado por la Mvz. María Dolores Astudillo, Guardaparque PNS/VS, posterior a la Inspección del Herbario.

**2. Duración de la Patente:**

Del 29/03/2018 al 29/03/2019

**3.- Beneficiario:**

Escuela Politécnica de Chimborazo, Representante Legal Ing. Byron Vaca Barahona PhD, en calidad de Rector.

**4.- Obligaciones del beneficiario:**

4.1.- Llevar el registro de las actividades realizadas

4.2.- Presentar un informe anual para la renovación de la patente y aquella que le fuera requerida por la autoridad.

4.3.- Regirse a las disposiciones citadas al reverso del presente documento.

4.4.- Facilitar información y el acceso de los funcionarios y autoridades de control a sus instalaciones, para el control de las actividades autorizadas en esta patente.

4.5 Comunicar cualquier novedad a la Autoridad Ambiental en un plazo de 48 horas.



MINISTERIO  
DEL AMBIENTE

DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO

CONDICIONES PARA LA VIGENCIA DE LA PATENTE ANUAL DE  
FUNCIONAMIENTO DE CTMVS

NRO: 01-2018-DPACH-UPN-CTMVS- HERBARIO

1. Se autoriza el manejo de especímenes de flora con fines educativos de las especies recolectadas con autorizaciones de Investigación científica.
2. El titular se obliga a llevar el registro completo de los especímenes en el que conste: Origen, procedencia, identificación taxonómica, archivo fotográfico, número de colección botánica y el número de referencia que mantendrá el herbario.
3. Para incremento de la colección mediante colecta, el titular deberá solicitar autorización del Ministerio del Ambiente, adjuntando el detalle de las especies y los sitios de colecta.
4. En este centro se encuentran 16967 especímenes de flora.
5. Según TULSMA Libro IV, Art. 124 se establece que Las actividades permitidas en los centros de tenencia y manejo de flora silvestre, son las siguientes:  
En los Herbarios: préstamo, donación e intercambio con otros herbarios (exportación – importación), colección, investigación y educación.
6. Para las especies incluidas en el apéndice CITES y que no son originarias del Ecuador, el titular deberá presentar los justificativos con respaldo que documenten la procedencia y /o adquisición legal de los mismos.
7. El traslado de especímenes deberá contar con la respectiva orden de movilización, emitida por el Director Provincial del Ministerio del Ambiente y presentada para verificación en los controles.
8. El titular se obliga a disponer del espacio para mantener la colección y cuidado de los especímenes.
9. Debe conservarse el original de este documento en la Oficina del Centro de Manejo para efecto de los respectivos controles establecidos.
10. El presente documento no autoriza la colección de especímenes de flora.
11. Para la renovación de patente de funcionamiento anual: Según TULSMA, Libro IV, Título IV, Artículo 128: el Centro de Tenencia y Manejo deberá presentar un informe de sus actividades y el programa de trabajo para el siguiente año, los mismos que deberán ser aprobados por el Distrito Regional correspondiente, así como haber cumplido cualquier disposición del Ministerio del Ambiente, relacionada al mejor manejo de los especímenes.  
El mencionado informe deberá contener la siguiente información:
  - Nombre del centro de tenencia y manejo de vida silvestre
  - Actividades realizadas en función de los objetivos del centro y según las disposiciones establecidas en la respectiva patente de funcionamiento
  - Inventario de los especímenes (reclutamiento, bajas, intercambios, compra - ventas, etc.)
  - Modificaciones en la infraestructura
  - Cambios en el personal.
12. **Exoneración de pago de tasa:** Según TULSMA, Libro IX, Título II, Tablas.



Ambato, 05 de abril del 2018

Of. 03-AMAS-2018

**A QUIEN INTERESE**

Presente.-

De mis consideraciones:

Yo José Homero Vargas López curador del Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato (AMAS) certifico haber revisado un espécimen botánico que corresponde a la Familia Piperaceae cuyo nombre científico es *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. de las Srtas. Verónica Ortiz y Belén Moyano egresadas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Es todo cuanto puedo certificar.

Atentamente,

PhD. José Homero Vargas López  
CURADOR HERBARIO (AMAS)

