

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**ACTIVIDAD ANTIUREASA, ANTITIROSinASA Y ANTIOXIDANTE DE  
ESPECIES NATIVAS DEL GÉNERO *Piper* CON POTENCIAL APLICACIÓN EN  
MEDICINA, COSMÉTICA Y CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS**

**SEMINARIO DE INVESTIGACION**

Presentado por

**HIRMA FABIANA ALMEDA TABLAS  
LAURA MARÍA ASTORGA DOMÍNGUEZ  
ANDREA DEL CARMEN ORELLANA URRUTIA  
LIGIA IZABEL SAMPUEL GUZMÁN  
PAOLA ALEJANDRINA SIERRA ILLESCAS**

**PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
QUÍMICAS BIOLÓGAS**

GUATEMALA, MARZO DE 2,014

## **JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo Jose Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS NUESTRO PADRE**

Por ser nuestro guía, darnos fortaleza en todo momento y permitirnos alcanzar una meta más en nuestras vidas.

### **A NUESTROS PADRES**

Lesbia Guzman, Edgar Sampuel, Sandra de Sierra, Edgar Sierra, Hirma Tabla, Gladis Urrutia, Leonel Orellana, Griselda de Astorga y Armando Astorga. Por su gran amor, por ser unos padres maravillosos y excepcionales, quienes con esfuerzo y dedicación han estado en cada etapa de nuestra vida, brindándonos consejos y ejemplo de perseverancia siempre. Gracias a ellos estamos hoy aquí. ¡Nuestros triunfos son suyos!

### **A NUESTROS HERMANAS Y HERMANOS**

Por su apoyo y amor, siendo además grandes amigos para toda la vida.

### **A NUESTROS FAMILIARES Y AMIGOS**

Por su compañía, apoyo, paciencia y cariño.

### **A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

Por brindarnos los conocimientos y enseñanzas necesarias para nuestra formación académica.

### **A TODAS LAS PERSONAS E INSTITUCIONES, en especial al Lic. Armando Cáceres, Licda. Isabel Gaytán, Lic. Federico Nave y MSc. María Eugenia Paredes.**

Por brindarnos su ayuda y apoyo condicional en todo momento.

## ÍNDICE

Págs.

<b>I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN</b>	01
<b>II. RESUMEN</b>	02
<b>III. ANTECEDENTES</b>	04
<b>A. Actividad antitirosinasa</b>	04
1. Generalidades	04
2. Melanogénesis y tirosinasa	05
3. Compuestos inhibitorios de la tirosinasa	08
4. Metodología para determinación de actividad antitirosinasa	09
a. Determinación de la actividad antitirosinasa por medio de método colorimétrico	09
b. Determinación de la actividad antitirosinasa por medio de Western blot	10
c. Determinación de la actividad antitirosinasa por medio de cromatografía de capa fina (TLC)	11
d. Plantas medicinales con actividad antitirosinasa	13
<b>B. Actividad antiureasa</b>	15
1. Generalidades	15
2. Estructura y mecanismo de acción de la ureasa	16
3. Organismos que producen la enzima ureasa	18
4. Compuestos que favorecen la inhibición de la actividad enzimática	19
5. Mecanismos de acción de los compuestos que inhiben la actividad	20

de la enzima	
a. Inhibidores químicamente similares dirigidos al sitio activo	20
b. Compuestos diferentes al sustrato o inhibidores del mecanismo	21
6. Metodología para determinación de inhibición de la actividad ureasa	21
7. Plantas medicinales con actividad inhibitoria de la enzima ureasa	22
<b>C. Actividad antioxidante</b>	23
1. Generalidades	23
2. Metodología para evaluar la actividad antioxidante	26
a. Principales métodos usados para medir actividad antioxidante	26
b. Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)	28
3. Plantas medicinales con actividad antioxidante	29
<b>D. Descripción del género <i>Piper</i></b>	30
<b>E. Fichas técnicas de especies <i>Piper</i> a estudiar</b>	32
1. <i>Piper amalago</i> L.	32
2. <i>Piper auritum</i> HBK.	34
3. <i>Piper hispidum</i> Swartz.	35
4. <i>Piper jacquemontianum</i> Kunth.	37
5. <i>Piper oradendron</i> Trelease & Standley.	39
6. <i>Piper psilorhachis</i> C. DC.	40

7. <i>Piper retalhuleuense</i> Trelease & Standley.	41
8. <i>Piper sempervirens</i> (Trelease) Lundell.	42
9. <i>Piper umbellatum</i> L.	43
10. <i>Piper variable</i> C. DC. ex Donn. Smith.	45
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	47
<b>V. OBJETIVOS</b>	48
<b>VI. HIPÓTESIS</b>	49
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	50
<b>A. Universo de trabajo y muestra</b>	50
<b>B. Recursos</b>	50
<b>C. Materiales y Métodos</b>	51
<b>1. Materiales</b>	51
<b>2. Equipo</b>	52
<b>3. Reactivos</b>	53
<b>4. Procedimiento</b>	54
a. Recolección y desecación de especies <i>Piper</i> .	54
b. Obtención de extractos diclorometánicos y metanólicos por la técnica de percolación.	55
c. Evaluación de la actividad antitirosinasa.	56
d. Evaluación cualitativa de la actividad inhibidora de ureasa.	58
e. Evaluación de la actividad antioxidante.	59

<b>D. Diseño de la investigación</b>	60
<b>VIII. RESULTADOS</b>	64
A. Inhibición de tirosinasa.	69
B. Inhibición de ureasa.	72
C. Reduccion del hierro.	74
<b>IX. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	75
<b>X. CONCLUSIONES</b>	85
<b>XI. RECOMENDACIONES</b>	86
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	87
<b>XIII. ANEXOS</b>	99

## I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

*Piper* es un género de angiospermas basales de gran diversidad biológica y química. Desde el 2007 se han realizado varias investigaciones de especies americanas y algunas endémicas de Guatemala del género *Piper*. Con financiamiento del Fondo de Desarrollo de Ciencia y Tecnología (FODECYT), la iniciativa guatemalteca ha investigado veinte especies nativas y ha generado una red internacional de evaluación del género *Piper* en el marco de RIPRONAMED con financiamiento del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

En el presente proyecto se pretendió contribuir al estudio de la actividad biológica de diez especies del género *Piper* nativas de Mesoamérica, para determinar la actividad antioxidante, antiureasa y antitirosinasa por un método micrométrico.

Durante el desarrollo de la presente investigación se contó con el equipo, procedimiento y apoyo profesional del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, para efectuar la extracción fraccionada de la materia vegetal; dicha técnica facilitó la separación de la droga vegetal de todos aquellos componentes mediante el uso de disolventes selectivos y de diferente polaridad. Además se contó con material, equipo y apoyo profesional de la Unidad de Bioensayos de Citohistología, para la realización de los ensayos enzimáticos. Los proyectos de LIPRONAT han analizado la actividad antioxidante y biocida de dieciocho especies de *Piper*. Investigaciones recientemente realizadas en Guatemala han permitido conocer la composición de extractos, de manera que se establecieron metodologías para evaluar las diferentes actividades y conocer el potencial de especies nativas de *Piper* en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas.



## II. RESUMEN

La tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración del pelo, piel y ojos, inhibidores de la tirosinasa pueden ser clínicamente útiles para el tratamiento de algunos trastornos dermatológicos asociados con la hiperpigmentación por alta producción de melanina; también se utiliza en cosmética para despigmentación después de quemaduras.

La ureasa (urea amidohidrolasa) es una enzima que se encuentra distribuida en algas, bacterias, hongos y plantas. Esta cataliza la hidrólisis de la urea para la producción de amoníaco, que cambia el pH del sitio en donde actúa; en el sistema gastrointestinal se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas y en el sistema urinario ha demostrado estar implicado en la formación de cálculos renales, por la precipitación de algunos compuesto al enfrentarse al cambio de pH.

El sistema antioxidante se encarga de proteger los tejidos atrapando los radicales libres, interviniendo en los pasos de iniciación, propagación o finalización de procesos oxidativos. Es necesario su reemplazo constante por medio de la ingesta en la alimentación. Las plantas han demostrado poseer actividad antioxidante pues cuentan con una amplia variedad de moléculas secuestrantes de radicales libres como polisacáridos y polifenoles.

El presente estudio tuvo como objetivo la determinación de actividad antiureasa, antitirosinasa y antioxidante de extractos diclorometánicos y metanólicos, obtenidos de las especies nativas del género *Piper*, *P. amalago*, *P. auritum*, *P. hispidum*, *P. Jacquemontianum*, *P. oradendron*, *P. psilorhachis*, *P. retalhuleuense*, *P. sempervirens*, *P.*

*umbellatum*, *P. variabile*. En esta investigación se determinó la actividad inhibitoria de la tirosinasa y ureasa por ensayos enzimáticos, cualitativos, cromatografía de capa fina (TLC) y cuantitativos (método cinético espectrofotometria), la actividad antioxidante fue evaluada por el método cuantitativo, poder antioxidante reductor del hierro (FRAP).

Todas las muestras fueron analizadas por quintuplicado y se utilizaron soluciones estándar como referencia para verificar la eficacia de los ensayos, siendo todas estadísticamente significativas, evaluadas con un intervalo de confianza del 95%.

Las especies del género *Piper* que presentaron mejor actividad fueron, en la inhibición de la actividad tirosinasa *P. variabile* con un valor de  $CI_{50}$  de 2.0  $\mu\text{g/mL}$  en el extracto diclorometánico, la mayor inhibición de la actividad de ureasa la presentó *P. psilorachis* con un valor de  $CI_{50}$  de 1.9  $\mu\text{g/mL}$  en el extracto metanólico y también presento el mayor poder reductor de hierro según los valores obtenidos de  $CI_{50}$  con un valor de 2.1  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo ninguno de los intervalos de confianza de los extractos analizados se encuentran entre el rango obtenido para los estándares en los tres ensayos, por lo que se concluye que a pesar que las especies presentan actividad, ninguna presenta una actividad tan eficaz como los estándares.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Actividad antitirosinasa

##### 1. Generalidades

Según Tripathi y colaboradores (1992), las hiperpigmentaciones, tales como lentigo senil, melasma, pecas pigmentadas y cicatrices de acné, son de particular interés para las personas ya que pigmentos de melanina se encuentran también en el cerebro de los mamíferos, por la enzima tirosinasa que juega un papel en la formación neuromelanina en el cerebro del ser humano. Esta enzima oxidasa de función mixta podría ser fundamental para neurotoxicidad de dopamina y pueden contribuir a la neurodegeneración asociado con la enfermedad de Parkinson (Casañola et al., 2007).

Según estudios realizados por Kim y colaboradores (2002), la tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración del pelo, piel y ojos. También es conocida como la polifenol oxidasa (PPO), es una enzima multifuncional que contiene cobre. Es catalizadora en la oxidación de monofenoles, *O*-difenoles y *O*-quinonas. La tirosinasa es conocida por ser una enzima clave para la biosíntesis de melanina en las plantas y animales. Según estudios realizados por Lin y colaboradores (2007), inhibidores de la tirosinasa pueden ser clínicamente útiles para el tratamiento de algunos trastornos dermatológicos asociados con la hiperpigmentación por alta producción de melanina; ellos también encuentran usos en cosmética para despigmentación después de quemaduras. Además, la tirosinasa es conocida por estar involucrada en el proceso de muda de los insectos y la adherencia de organismos

marinos. Los inhibidores de la tirosinasa se han utilizado en productos cosméticos que se promueven para aclarar la piel (Chiari, Joray, Ruiz, Palacios & Carpinella, 2010).

Los tratamientos tópicos estándar para los trastornos de hiperpigmentación incluyen inhibidores de la tirosinasa, algunos compuestos con actividad inhibitoria se utilizan en medicina, pero la mayoría de ellos no reúnen todos los requisitos de eficacia clínica, o se observan efectos adversos (Casañola et al., 2007).

La búsqueda de los agentes químicos naturales capaces de modular el metabolismo de la pigmentación es de gran interés. Por lo tanto, varios han sido probados como cosméticos y productos farmacéuticos para evitar el exceso de melanina en las capas epidérmicas o como agentes blanqueadores (Baurin, Arnoult, Scior, Do & Bernard, 2002).

Los compuestos para aclarar la piel deben cumplir al menos los siguientes criterios antes de realizar más pruebas. En primer lugar, ser inhibidores de la enzima, preferiblemente con la capacidad de coordinación con los aniones cobres en el sitio activo de la tirosinasa. Esta propiedad confiere cierta especificidad hacia la tirosinasa, puede aumentar la unión y así mejorar la inhibición. En segundo lugar, deben presentar una baja toxicidad. Desafortunadamente, algunos compuestos con la capacidad para coordinar metales pueden ser muy tóxicos, y deben ser descartados. Algunos compuestos evaluados no son tóxicos para las células no-melanocitos (p. ej. queratinocitos), pero se vuelven tóxicos cuando se actúa sobre la tirosinasa y se convierten en quinonas dentro de los melanocitos (Curto et al., 1999).

## 2. Melanogénesis y tirosinasa

La melanogénesis es un proceso fisiológico que resulta en la síntesis de los pigmentos de melanina, que desempeñan un papel crucial protector contra

fotocarcinogénesis de la piel. La melanina se forma en células especializadas, los melanocitos en el transcurso de un proceso bioquímico que lleva el nombre de metalogénesis y representa una parte de una serie compleja de acontecimientos que comienzan desde el metabolismo del aminoácido tirosina por la enzima tirosinasa (Casañola et al., 2007).

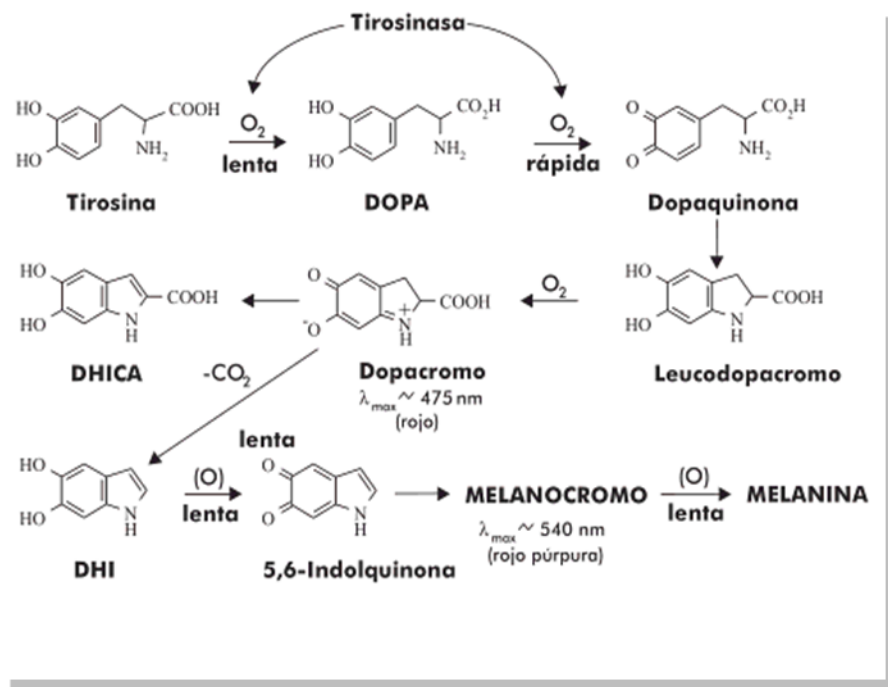
El componente dominante de color de la piel normal se proporciona por la melanina que es un heteropolímero compuesto de indol que se produce dentro de los melanosomas por la acción de la enzima tirosinasa que es el material precursor en los melanocitos (Nakashima et al., 2010).

La tirosinasa es una enzima clave para la biosíntesis de melanina, se centra principalmente en la catalización de dos reacciones distintas en la síntesis de melanina según Casañola y colaboradores (2007). La hidroxilación de L-tirosina (actividad monofenólica de la tirosina) a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y la oxidación de L-DOPA (actividad difenolasa), para dar lugar a dopaquinona (Lee, Kim & Kim, 1997; Kyeong, Kim, Hyun, Sang & Ho, 2011).

Después de una conversión de dopaquinona a dopacromo, dopacromo tautomerasa (proteína relacionada con tirosinasa-2, DCT/TRP-2) cataliza la conversión de dopacromo a 5,6 - dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). Posteriormente, DHICA se convierte en indol-quinona carboxílico ácido por DHICA oxidasa proteína relacionada con tirosinasa 1, (TRP-1) y transformarse en melanina mediante en una serie de reacciones no enzimáticas. En general, la actividad de tirosinasa y los niveles de proteína de tirosinasa, TRP-1, y TRP-2 se correlaciona directamente con el contenido de melanina. Es demostrado que los melanocitos derivados de una piel pálida, tienen un contenido de melanina bajo, siempre tienen menores niveles de actividad tirosinasa, TRP-1, y TRP-2 en los melanocitos

derivados de la piel más oscura, con un mayor contenido de melanina con altos niveles de actividad tirosinasa (Fang, Tsuji & Setaluri, 2002).

Las proteínas relacionadas con la tirosinasa en humanos (TYRPs) incluyen las enzimas de la tirosinasa y una familia de estrecha relación de los melanocitos, productos específicos de genes implicados en la síntesis de melanina. Las localizaciones cromosómicas de los locus que contienen los tres genes humanos TYRP se han determinado y se han realizado investigaciones de polimorfismos que podrían explicar la variación natural en la pigmentación y de varios estados de hipopigmentación (Fang et al., 2002).



**Figura 1:** Mecanismo de la melanogénesis

Fuente: (Fang et al., 2002).

Recientemente se ha demostrado que otros factores tales como iones metálicos también contribuyen a la producción de melanina. Existen además tres cromóforos que

contribuyen al color de la piel, la hemoglobina, oxihemoglobina, carotinoides (Ul-Haq et al., 2006).

### 3. Compuestos inhibitorios de la tirosinasa

El uso de inhibidores de la tirosinasa, tales como ácido kójico e hidroquinona es cada vez más importante en la industria cosmética debido a sus efectos anti-pigmentación (Momtaz et al., 2008).

Los aniones para amortiguar son útiles en el rango de pH de 4 a 7, son potentes inhibidores de la tirosinasa, particularmente por debajo de pH 5.5, entre los tampones que se utilizan, se encuentra el fosfato de sodio, 0.1 M, con pH 7.0, para las mediciones cinéticas (Duckworth & Coleman, 1969).

En el pasado, eran los sulfitos ampliamente utilizados como inhibidores de la tirosinasa por su efecto antipardeamiento. Sin embargo, su uso ha sido regulado con el fin de asegurar al consumidor seguridad, ya que estos conservantes afectan la calidad nutricional de los alimentos y puede causar reacciones alérgicas, así como gastrointestinales. La arbutina, de origen natural (beta-D-glucopiranosido de hidroquinona), es utilizada tradicionalmente para despigmentación (Baurin et al., 2002).

Otros compuestos con actividad inhibidora de la tirosinasa, incluyen el pirocatecol es conocido como inactivador de la tirosinasa, como su producto de oxidación. Compuestos que pertenecen a diferentes subsistemas, tales como los derivados de azobenceno, tripéptido ácido kójico, análogos del oxadiazol, derivados longifolene, derivados del ácido glicirretínico, nitros hidroxilaminas, catequinas, ésteres de ácidos gentísico, compuestos de hidroxiestilbeno, y benzaldoximes, ácido salicilidroxámico, catequinas, la hidroquinona, resveratrol y oxiresveratrol (Casañola et al., 2007; Lim, Lim & Yule, 2009).

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA por sus siglas en inglés) ha aprobado productos farmacéuticos que contienen 2.4% de hidroxiquinona (HQ) ya que son moderadamente eficaces, pero HQ se considera citotóxico para melanocitos y potencialmente mutágenos para células de mamíferos (Curto et al., 1999).

#### 4. Metodología para determinación de actividad antitirosinasa

Se han realizado variedad de estudios para la demostración y evaluación de la actividad antitirosinasa, para lo cual se han utilizado diversas metodologías, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Sin embargo las determinaciones de la capacidad antitirosinasa realizadas *in vitro* solo proporcionan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kohen & Nyska, 2002).

##### a. Determinación de la actividad antitirosinasa por medio de espectrofotometría

Un método espectrofotométrico para que sea cuantitativo requiere que:

- El método sea selectivo para el analito que se desea analizar.
- Esté libre de interferencias que afecten el resultado analítico ó que las interferencias se puedan controlar.
- Tenga alta precisión y exactitud.
- Tenga una alta sensibilidad.
- El límite de detección corresponda a una concentración baja (Kohen & Nyska, 2002).

Experimentalmente para el establecimiento de un método espectrofotométrico, después de optimizar las condiciones químicas del sistema (pH, temperatura, control de interferentes, concentración adecuada de reactivos, solvente apropiado, protección a la luz



para evitar reacciones fotoquímicas, etc.) que garanticen que se tiene la especie de interés en condiciones adecuadas para la medida, el principio involucra la absorción de radiación ultravioleta visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor, utiliza radiaciones del campo UV de 80 a 400 nm, principalmente de 200 a 400 nm (UV cercano) y de luz visible de 400 a 800 nm, por lo que es de gran utilidad para caracterizar las soluciones en la región ultravioleta-visible del espectro. Se rige por una ley muy importante: la ecuación de Beer-Lambert. En la metodología se utiliza L-DOPA como substrato y de L-tirosina, tampón fosfato (pH 6.5). El aumento de la absorción se mide a la formación de DOPAcromo y el porcentaje de inhibición de la actividad tirosinasa se calcula como sigue:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [(A - B)/A] * 100$$

Donde A= absorbancia a 475 nm sin muestra de ensayo (10 mL de solución (% , 50/50) de propilen-glicol /agua desionizada) y B= absorbancia a 475 nm con muestra de ensayo (10 mL de extracto de la planta). La presencia de oxiresveratrol (2,3', 4,5'-tetrahidroxistilbene) parece justificar la alta inhibición de la tirosinasa. Para los estándares (controles) se utiliza el ácido kójico y L-mimosina (Baurin et al., 2002; Casañola et al., 2007).

#### b. Determinación de la actividad antitirosinasa por medio de Western blot

Metodología en la cual se evalúan varias proteínas relacionadas con la tirosinasa, se utiliza para determinar el grado de expresión de la tirosinasa y los TRPs, en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel en este caso se utiliza gel poliacrilamida (10%), se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Luego son transferidas a una membrana

adsorbente PVDF (membranas Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella, anti-tirosinasa (C-19), anti-TRP1 (G-17), y anticuerpos anti-TRP2 (D-18), se añaden a una dilución 1:1000, y las membranas se incuban en una habitación a temperatura ambiente durante 3h. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por nitro azul tetrazolio (NBT) / 5 - bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP). De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras. La extensión de la carga de proteínas es evaluada por Western blot utilizando anticuerpo b-actina (Lin et al., 2007).

c. Determinación de la actividad antitirosinasa por medio de Cromatografía de Capa fina (TLC).

La cromatografía en capa fina (en inglés *thin layer chromatography*-TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química orgánica. Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado (Chiari et al., 2010).

La muestra a analizar se deposita cerca de un extremo de una lámina de plástico o aluminio que previamente ha sido recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o

varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente, los dos adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son la gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) y la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), ambas de carácter polar. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Chiari et al., 2010).

En el ensayo cromatográfico para determinar la inhibición de tirosinasa, las separaciones en capa fina se realizan en placas de vidrio o plástico que se recubren con una capa delgada y adherente de partículas finamente divididas; esta es la capa estacionaria. Los extractos se someten a la sílica gel/acetona: metanol 1:49. Se remueve de la fase móvil (Momtaz et al., 2008).

El revelado de las placas la mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). La presencia de un compuesto activo a la luz ultravioleta evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto, y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto (Chiari et al., 2010).

En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados, en la metodología para la

determinación de la inhibición se utiliza L-tirosina como sustrato dando así un compuesto coloreado gris-purpura (Curto et al., 1999).

d. Plantas medicinales con actividad antitirosinasa

En la búsqueda de actividad antitirosinasa se han realizado varios estudios en material vegetal en Asia, siendo el primero en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Kinki, Japón por Matsuda y colaboradores (1996), quienes demostraron que extractos de las hojas de *Arctostaphylos patula*, *A. viscida*, *A. canescens*, *A. columbiana*, *A. nevadensis* y *Arctostaphylos uva-ursi*, tienen actividad antitirosinasa y actúan en la biosíntesis de la melanina. En un estudio más reciente, Nakashima y colaboradores (2010) demostraron que extractos metanólicos de la hoja de *Anastatica hierochuntica*, inhibe la melanogénesis en las células 4A5 del melanoma B16, estimuladas por teofilina. En Corea, Lee y colaboradores (1997), estudiaron doce extractos vegetales de los cuales *Morus alba* y *Rheum palmatum* presentaron la mayor inhibición de la actividad, demostrando una inhibición del 50% a concentración de 333 mg/mL. Otro estudio de Ul-Haq y colaboradores (2006), demostraron que el extracto de raíz de *Vitex negundo*, puede ser inhibidor de la enzima tirosinasa y puede ser utilizado para el tratamiento de la hiperpigmentación asociada con una alta producción de melanocitos.

En China, Lin y colaboradores (2007) estudiaron extractos de la hoja de *Malus doumeri* var. *Formosana* demostrando la capacidad para inhibir la actividad de la enzima tirosinasa y reducir el contenido de melanina. En Turquía, Özer y colaboradores (2007), demostraron que los extractos de *Juglans regia*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Castanea sativa* poseen inhibición de la enzima tirosinasa, siendo *J. regia* la de mayor inhibición a una concentración de 500 mg/mL. En la India, Rout & Banerjee (2007), demostraron que la corteza de *Punica granatum* posee actividad antitirosinasa según. Un estudio en Malasia

por Mohd y colaboradores (2008), demostró la actividad antitirosinasa en cuatro especies del bambú donde solamente *Gingantochloa ligulata* y *Schizotachyum zollingeri* presentaron inhibición en la ruta enzimática de la biosíntesis de melanina. Otro estudio también demostró que los extractos metanólicos de hoja de *Macaranga gigantea*, *M. pruinosa*, *M. tanarius* y *M. trilob*, poseen actividad de inhibición de la enzima (Lim et al., 2009).

Un estudio en Taiwán por Wang y colaboradores (2010), demostró que la hoja de *Michelia alba*, es un inhibidor de la tirosinasa humana y antioxidante, otro estudio demostró que las ramas de *Distylium racemosum* poseen actividad de inhibición de la tirosinasa (Kyeong et al., 2011).

En Francia, Baurin y colaboradores (2002) investigaron 67 extractos de los cuales solamente *Stryphnodendron barbatimao*, *Portulacca pilosa*, *Cariniana brasiliensis*, *Entada africana* y *Prosopis africana*, presentaron 90% de inhibición de la tirosinasa.

En África, Momtaz y colaboradores (2008), demostraron la inhibición de la actividad de tirosinasa en corteza de *Sideroxylon inerm*. Un estudio de Abdillahi y colaboradores (2011), demostraron que cuatro especies de *Podocarpus* inhibieron la actividad de la enzima tirosinasa en una dosis dependiente.

El único estudio encontrado de Latinoamérica, Argentina, fue uno de Chiari y colaboradores (2010), que demostraron inhibición de la actividad de la tirosinasa en 91 plantas nativas, dando así *Dalea elegans*, *Lepechinia meyenii*, *L molleoides* y *Thalictrum decipiens* potentes valores de  $CI_{50}$ , siendo estas 0.48, 10.43 y 3.77  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

En Guatemala no se ha estudiado ninguna especie vegetal por su actividad inhibidora de la tirosinasa.

## **B. Actividad antiureasa**

### 1. Generalidades

Cada organismo descompone los ácidos nucleicos y proteínas, generando así residuos nitrogenados, ya que los ácidos nucleicos y proteínas contienen nitrógeno. Mamíferos, anfibios y algunos invertebrados excretan residuos nitrogenados como la urea, que se produce en el hígado y poca cantidad en los riñones. La urea es un compuesto especialmente bueno para la eliminación de nitrógeno debido a que es soluble en agua y menos tóxico (Vincent, 1981, Capítulo 12).

La urea es un compuesto de desecho que se forma a partir del amoníaco, que es el principal catabolito en el metabolismo de las proteínas. Las proteínas se simplifican en aminoácidos; los cuales que no serán utilizados en el organismos pasan por un proceso de desaminación que conduce la al formación del amoníaco, el cual al combinarse con compuesto presentes en el medio ( $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ) forman urea. Esto se conoce como ureogénesis (Vincent, 1981, Capítulo 12).

La ureasa (urea amidohidrolasa) es una enzima que se encuentra distribuida en algas, bacterias, hongos y plantas. Esta cataliza la hidrólisis de la urea para la producción de amoníaco, que cambia el pH del sitio en donde actúa; en el sistema gastrointestinal se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas y en el sistema urinario ha demostrado estar implicado en la formación de cálculos renales, por la precipitación de algunos compuesto al enfrentarse al cambio de pH. La estructura, número, tipo de subunidades, peso molecular y secuencia de aminoácidos depende de su origen. Aparte de estas diferencias, las secuencias de aminoácidos en los sitios activos y el mecanismo de la

actividad enzimática son los mismos (Paulo, Oleastro, Gallardo, Antonio & Domínguez, 2011).

Los compuestos que inhiben las enzimas son de suma importancia en el tratamiento de una serie de enfermedades, el conocer inhibidores específicos de una enzima evita el desarrollo de la enfermedad. Ya que la ureasa se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas, la búsqueda de compuestos inhibitorios que actúen en el sitio activo de la enzima, se ha intensificado (Chávez et al., 2011).

## 2. Estructura y mecanismo de acción de la ureasa

La ureasa es un hexámero consiste en seis cadenas idénticas en las plantas. En bacteria, consiste en dos o tres subunidades diferentes. Las principales diferencias estructurales se han observado entre las enzimas derivadas de plantas y microorganismos por ejemplo la ureasa de la bacteria *Klebsiella aerogenes* posee tres tipos de subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ . Así mismo la ureasa de *Bacillus pasteurii* posee los mismos tipos de subunidades. La ureasa aislada de *Canavalia ensiformis* conocida como Jack Bean también, consiste de seis subunidades, cada subunidad contiene dos átomos de níquel. En las subunidades el níquel está coordinado a ligandos de nitrógeno y oxígeno, y los enlaces nitrógeno-oxígeno pueden posiblemente ser desplazado por moléculas de agua durante las reacciones hidrolíticas (Amtul, Atta-ur-Rahman, Siddiqui & Choydhary, 2002).

Aun cuando existen estas diferencias, el sitio activo de la enzima contiene dos moléculas de níquel como fue mencionado anteriormente, estas moléculas que atraen el sustrato, siendo las principales moléculas catalizadoras del proceso, al unirse el sustrato con la enzima, esta última cambia su conformación evitando la separación del complejo sustrato-enzima (Arfan et al., 2010).

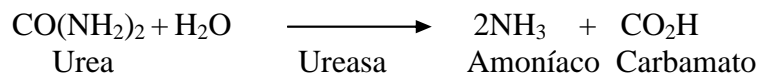
El uso proporcionado por esta enzima depende del organismo que la produzca, por ejemplo la bacteria *Helicobacter pylori*, la cual es una bacterias patógena para el tracto urinario, que utiliza la enzima para el cambio de pH del medio. En las plantas la enzima se utiliza para obtención de nitrógeno ya que estas no tienen acceso directo a una fuente de nitrógeno. La enzima ureasa de *H. pylori* se descompone en dos monómeros: una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  cada una de estas distribuidas de diferente manera comparadas con la ureasa de otras bacterias. Esta enzima es capaz de estimular la respuesta humoral específica, la quimiotáxis de monocitos, de neutrófilos y de activar las funciones de los macrófagos (Krajewska & Brindell, 2011).

En las plantas la ureasa se utiliza con dos funciones principales:

- La utilización de urea como una fuente de nitrógeno.
- Mecanismo de defensa frente a patógenos.

La enzima ureasa es necesaria pues la degradación de un aproximado de 10 Kg de urea se da con una vida media de aproximadamente 3.6años, pero en presencia de esta enzima la hidrólisis de la urea es  $10^4$  veces más rápida. Luego de la hidrólisis inicial de la urea se dan como subproductos carbamato y amoníaco que luego estos se hidrolizan y forman así el ácido carbónico y otra molécula de amoníaco; este último se desprotona con agua en pH fisiológico mientras que el ácido carbónico se disocia causando así un incremento en el pH (Amtul et al., 2002; Shi, Liu, Liu & Gu, 2010).

La reacción que se lleva a cabo se representa de la siguiente manera:





### 3. Organismos que producen la enzima ureasa

En estudios realizados se ha demostrado que la ureasa de plantas y bacterias presenta mayor similitud, que entre animales y bacterias. Entre las bacterias que producen la ureasa se encuentran: *Proteus* sp., *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus pasteurii*, *Ureaplasma urealyticum*, y *H. pylori* en esta última se ha estudiado con mayor detenimiento la acción de esta enzima por considerarse un factor de virulencia, como fue mencionado anteriormente (Amtul et al., 2002).

Aun cuando muchos organismos pueden convertir la urea en amonio para la obtención de nitrógeno sin la utilización de la enzima ureasa, la presencia de esta acelera el proceso en una proporción de  $10^4$ . Es por esta razón que en algunas bacterias la enzima se considera un factor patológico, pues está implicada en la alcalinización del medio o la utilización de urea como fuente de nitrógeno (Amtul et al, 2002).

La bacteria *H. pylori* rápidamente hidroliza la urea como parte de su método de supervivencia a partir de la producción de la enzima ureasa, para poder alcalinizar la bolsa gástrica y colonizarla. Según Paulo y colaboradores (2011), por esta razón se ha implicado como el agente etiológico de la gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y otros trastornos relacionados. También explica la asociación de la bacteria con los espacios intercelulares del epitelio gástrico, por los cuales se excreta la urea (Chávez, Aranda, García & Pastene, 2011; Saboury, Poorakbar & Rezaei, 2010).

Desafortunadamente, la erradicación de *H. pylori* ha demostrado ser difícil, por lo que se utiliza terapia triple con al menos dos antibióticos y un inhibidor de la bomba de protones, este tratamiento presenta una tasa de erradicación del 90%. Sin embargo, estos regímenes complicados, tienen importantes efectos secundarios y problemas de cumplimiento, a menudo llevando a la recaída (Quilez et al., 2010).

Puesto que la curación completa no siempre se logra con triple tratamiento, actualmente se buscan otros agentes terapéuticos. Así, en los últimos años un interés creciente en los compuestos biológicamente activos, incluyendo antioxidantes a partir de plantas y otras fuentes naturales (Hassani et al., 2009; Paulo et al., 2011).

Entre las plantas que producen la ureasa se encuentra *C. ensiformis*, en la que se ha identificado la enzima ureasa con mayor similitud con algunas ureasas bacterianas, siendo esta la razón de ser utilizada en una serie de ensayos para determinar si existen compuestos que inhiben la acción de la enzima, para luego aplicar su uso en infecciones bacterianas (Kosikowska & Brindell, 2011; Shi et al., 2010).

#### 4. Compuestos que favorecen la inhibición de la actividad enzimática

Al existir una gran cantidad de compuesto que actúan inhibiendo la enzima los mecanismos de acción actúan de distinta manera, pero la en la mayoría de mecanismos se da una inhibición de la enzima ureasa actúan de manera competitiva irreversible (Amtul et al., 2002).

Entre los principales los compuestos que inhiben la ureasa se encuentran:

- Ácido acetohidroxamínico (AHA); es el compuestos que presenta mayor actividad en medicamentos, es el más estudiado de los compuestos inhibitorios, actualmente es utilizado para el tratamiento rutinario de infecciones del tracto urinario.
- Compuestos derivados de la urea, ya que actúan de manera mimética, anulando así el sitio activo de la enzima.
- Cetonas
- Quinonas

- Compuestos heterocíclicos.
- Polifenoles
- Imidazoles

Se han encontrado más de 800 compuestos que son capaces de realizar esta acción, pero los compuestos que presentan mayor concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ) de ureasa, son los grupos de compuestos listados anteriormente, es importante mencionar que aunque estos han demostrado ser inhibidores de ureasa vegetal no se ha comprobado su acción con ureasa bacteriana. El grupo con el cual si se ha experimentado son los polifenoles, ya que se realizaron los ensayos para determinar su acción inhibitoria en ureasa bacteriana obtenida de *H. pylori* presentando resultados negativos (Amtul et al., 2002; Shi et al., 2010; Chávez et al., 2011).

#### 5. Mecanismos de acción de los compuestos que inhiben la actividad de la enzima

Al ser la ureasa un compuesto presenta un sitio activo con dos moléculas de níquel se realiza un inhibición competitiva en la mayoría de los mecanismos propuestos se trata de un inhibición irreversible.

Los mecanismos propuestos por Amtul (2002) se basa en la siguiente clasificación:

a. Inhibidores químicamente similares dirigidos al sitio activo, el primer tipo de mecanismos son los inhibidores dirigidos al sitio activo, que principalmente son quimiotipos y sus análogos. Ellos comparten una característica común: cada inhibidor crea un puente entre los dos iones paramagnéticos de níquel en el sitio activo de la enzima. Así, el níquel y los residuos de aminoácidos en el sitio activo están en una orientación similar al momento de la unión al sustrato de la ureasa. Tiourea y la hidroxiiurea son los principales

ejemplos de inhibidores similares al sustrato de la ureasa. La mayoría de los inhibidores de ureasa contiene grupos fuertemente básicos, que imitan el enlace amida del sustrato es decir la urea. Los derivados de ácido acetohidroxímico y fosfazenos actúan como parte de este mecanismo (Ahman & Mahummad, 2008).

b. Compuestos diferentes al sustrato o inhibidores del mecanismo, el compuesto inhibidor no tienen ninguna similitud estructural con el sustrato de la enzima (urea), más bien, están diseñados para interferir con el mecanismo de la enzima, afectando la catálisis que conduce a la inactivación enzimática. Tales compuestos también son llamados inhibidores "basados en el mecanismo" (Ahman & Mahummad, 2008).

Los fosforodiamidos e imidazoles son típicos inhibidores basados en el mecanismo. Los inhibidores no similares al sustrato no son compuestos reactivos a diferencia del sustrato o el producto de la enzima objetivo. La enzima se convierte en su forma reactiva, que luego se inactiva, antes liberar el compuesto por un lanzamiento del sitio activo. El potencial de tales inactivadores de enzimas basados en el mecanismo, en las drogas de diseño ha sido revisado recientemente (Ahman & Mahummand, 2008).

## 6. Metodología para determinación de inhibición de la actividad ureasa

Las metodologías utilizadas para el estudio *in vitro* de la inhibición de esta enzima son dos principalmente, la primera es propuesta por Tanaka y colaboradores (2003), que se basa en la identificación de los compuestos inhibidores con rojo de fenol; primero identificando la actividad por medio de una cromatografía de capa fina (TLC siglas inglés), luego se realiza una microdilución en placa determinando si se trata de ácido acetohidroxiamínico o un compuesto derivado de este que inhiba la acción de la ureasa (Shi et al., 2010; Tanaka et al., 2003).

La segunda metodología es propuesta por Weatherburn, en donde se realiza una identificación de inhibidores por medio de microplaca utilizando indofenol como revelador, se prepara un reactivo fenólico, y un reactivo alcalino en un medio levemente ácido pH 6.8, el indolfenol revela la presencia de tiourea o compuestos derivados de este, que actúan como inhibidores de la ureasa (Ahmad & Mahummad, 2008).

#### 7. Plantas medicinales con actividad inhibitoria de la enzima ureasa

El estudio de compuestos activos en plantas se ha incrementando, para la obtención de medicamentos que inhiban enzimas de manera específica, algunos de los estudios han evaluado la actividad inhibidora de la ureasa, primero se dio como búsqueda de moléculas y luego en plantas evaluando la presencia de algunos de estos compuestos (Amtul et al., 2002).

El primer estudio identificado en esta revisión de literatura, sobre la búsqueda de actividad inhibidora de ureasa en especies vegetales es el de Tabak y colaboradores (1996), en Israel, donde se evaluaron 11 especies de plantas de las cuales cinco presentaron actividad inhibitoria de la ureasa siendo la planta más importante *Thymus vulgaris*. Ahmad y colaboradores (2008), en Pakistán, identificaron inhibición de la enzima en la planta completa de *Datisca cannabina*. Hassani y colaboradores (2009), en la India, demostraron que las hojas de *Camellia sinensis*, presenta inhibición de la enzima, pero en bajas concentraciones.

Arfan y colaboradores (2010), en Pakistán, estudiaron las ramas de *Hypericum oblongifolium*, en donde identificaron más de 10 compuestos altamente inhibitorios presentes en esta especie.

Un estudio realizado por Shi y colaboradores (2011), en China, evaluaron 15 plantas de las cuales la corteza de *Magnolia officinalis*, la semilla de *Cassia obtusifolia* y el fruto de *Forsythia suspensa*, presentaron una inhibición mayor al 50%, en el resto de especies se identificó inhibición de la enzima menor a 50%.

El único estudio encontrado realizado en Europa fue presentado por Juskiewicz y colaboradores (2004), en Polonia, los que comprobaron la actividad del ajo como inhibidor de la enzima ureasa.

Estudios realizados en el continente americano, se presentan a Quilez y colaboradores, Brasil, (2010) en donde evaluaron la actividad en la hoja de *Piper carpubya*, inhibiendo el crecimiento de *H. pylori* sin evaluar el mecanismo por el que se da la inhibición, sugiriendo que podría ser por una posible inhibición de la enzima ureasa. En otro estudio presentado por Chávez y colaboradores en Argentina, (2011), se estudio el epicarpio de *Persea americana* var. Hass, como planta inhibidora de ureasa vegetal y bacteriana (*H. pylori*).

En Guatemala no se ha estudiado ninguna especie vegetal por su actividad inhibidora de la ureasa.

## **C. Actividad antioxidante**

### **1. Generalidades**

Según Halliwell (2011), una sustancia antioxidante es aquella molécula que tiene como objetivo principal proteger un tejido biológico contra el daño oxidativo. Un radical libre una molécula inestable que contiene uno o más electrones no apareados, es decir, que posee un electrón impar en órbita, y tiende a buscar moléculas estables para formar

combinaciones con ellas y saturar sus electrones. A este proceso se le conoce como oxidación (Halliwell & Grootveld, 1987).

La oxidación es fundamental en el ser humano para la producción de energía, pero cuando la producción de oxígeno es incontrolada y existe un desequilibrio en la acción protectora de enzimas puede implicar la aparición de muchas enfermedades como artritis reumatoide y aterosclerosis; así como en procesos degenerativos asociados con el envejecimiento (Mau, Lin & Song, 2002).

El estrés oxidativo surge en sistemas biológicos después de una prolongada exposición a oxidantes, o debido a una disminución de la capacidad antioxidante del sistema; y está asociado con la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales están implicadas en la patología de numerosas enfermedades como el cáncer, por estas razones los radicales libres deben ser inactivados (Salcedo & García, 1998; Sánchez, Martínez & Fauré, 2011).

En las oxidaciones biológicas, los radicales libres más importantes, son el oxígeno y los derivados del mismo: el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los radicales libres reaccionan rápidamente con casi cada tipo de molécula biológica hallada en forma libre o formando parte de las diferentes estructuras celulares de los seres vivos, tales como: glúcidos, fosfolípidos, aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, lipoproteínas y membranas celulares (Venereo, 2002).

Los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofílicos), reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo; o en lípidos (hidrofóbicos), protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos (Vertuani, Angusti & Manfredini, 2004).

Chaudière & Ferrari-Iliou (1993), le dieron importancia relativa a algunos compuestos que contribuyen a la defensa antioxidante quelando los metales de transición y evitando que catalicen la producción de radicales libres en la célula. Particularmente importante es la capacidad de secuestrar el hierro, que es la función de proteínas de unión al hierro tales como la transferrina y la ferritina (Stohs & Bagchi, 1995; Salcedo & García, 1998).

En el sistema antioxidante, la vitamina E es más importante, ya que actúa en las membranas celulares interrumpiendo la reacción en cadena de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (Cui, Luo, Xu & Ven, 2004).

Según Quintanar & Calderón (2009), los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar en diversas formas, según la línea de defensa del organismo:

- Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su reacción, como proteínas que acumulan o transportan metales de transición.
- Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva, como la superóxido bismutasa, que cataliza la dismutación del oxígeno a agua.
- Sustratos antioxidantes., para reducir parcialmente a los radicales libres y las especies nativas.
- Enzimas que regeneran sustratos o co-sustratos antioxidantes como las enzimas que regeneran al glutatión reducido, la vitamina E y el NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato).
- Antioxidantes endógenos, como el glutatión, NADPH y albúmina.
- Antioxidantes exógenos, provienen de la dieta, tales como vitamina C y E.



– Sistemas de reparación, tratan de recuperar la función de las macromoléculas dañadas o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular.

## 2. Metodología para evaluar la actividad antioxidante

Se han realizado variedad de estudios para demostrar y evaluar la actividad antioxidante, sin embargo las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* solo proporciona una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. Estas metodologías también se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción en: secuestro de radicales libres, medición del potencial de óxido reducción, inhibición de reacciones de oxidación y auto-oxidación (Kohen & Nyska, 2002).

### a. Principales métodos usados para medir actividad antioxidante

En el método de difenilpicrilhidrazilo (DPPH), la actividad antioxidante se mide en términos de donar hidrógeno o de la capacidad atrapadora de radicales. La reducción y estabilización del DPPH por los antioxidantes da lugar a la decoloración de éste, produciendo una disminución de la absorbancia a 517 nm y se expresa como porcentaje de decoloración de la solución radicalaria a una concentración dada. La pérdida de color en la mezcla del ensayo, está determinada por las concentraciones de sustancia antioxidante (extracto), la concentración de DPPH y el tiempo de reacción. La actividad se expresa en términos de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) (Palomo et al., 2009; Tirzitis & Bartosz, 2010).

El método en el cual la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos viene determinada por su estructura química y dichos compuestos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales: como antiradicalarios y como quelantes de metales, se le conoce con el nombre de cuantificación de fenoles totales

mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. El mecanismo es una reacción redox fosfotúngstico y de ácido fosfomolibdico que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno (Re et al., 1999).

El ensayo TEAC/ABTS (Trolox equivalent antioxidant capacity), se basa en la inhibición por los antioxidantes del radical catiónico verde-azulado ABTS (2,2-azinobis-(3-etilenbenzotiazolin-6-sulfonato), cuyo espectro muestra un máximo de absorción a las longitudes de onda 415, 645, 734, 815 nm. Como patrón emplea el compuesto denominado Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. Para el desarrollo se suelen emplear dos estrategias: inhibición y decoloración, en la primera los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS y se determina la inhibición de la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verde-azulada. En la segunda estrategia, los antioxidantes se añaden una vez el ABTS se ha formado y se determina entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de éste (Mesa-Vanegas et al., 2009).

Una técnica de análisis químico y cuantitativo es la llamada cromatografía de capa fina (TLC), utilizada para separar sustancias puras de mezclas complejas, en el cual el flujo de un solvente líquido o gas promueve la separación de sustancias mediante migración diferencial, en un medio poroso absorbible. La TLC, es una técnica que consta de dos tipos de fase, una estacionaria y una móvil. Las ventajas de aplicar este procedimiento son la rapidez y el bajo costo de los experimentos. Las separaciones en capa fina se realizan en una placa de vidrio recubierta con una capa adhesiva delgada de partículas finamente divididas (Sharapin, 2000; Skoog, West, Holler & Crouch, 2005).

b. Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Este método está basado en la reacción redox  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ , con antioxidantes en la muestra y como resultado la creación de un color azul que se puede medir a 593 nm (Kohan & Nyska, 2002).

Kosem y colaboradores (2007), reportaron una correlación directa entre la actividad antioxidante y el poder reductor de ciertos extractos vegetales. Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro. La actividad antioxidantes de la fracción etil acetato es significativamente más fuerte que con otros. Hay diferencia insignificante en las actividades antioxidantes entre el extracto de etanol, el de n-butanol y la fracción de agua, mientras que el éter de petróleo la actividad es pobre. La reducción de hierro se mide utilizando un reactivo que actúe reduciendo el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , al encontrarse en estado reducido se le une cromóforo para la formación de complejos color azul, midiéndose con un espectrofotómetro a 630 nm (Mesa-Vanegas et al., 2010; Zhou et al., 2011).

Según Katalinic y colaboradores (2006), en un estudio reciente se evaluó por este método gran variedad de plantas, presentando mayor poder antioxidante *Melissa officinalis* y *A. uva-ursi*. Un estudio realizado por Murillo y colaboradores (2007), demuestra que otra planta que posee capacidad es la hoja y corteza de *Bauhinia kalbreyeri*. Un estudio de Céspedes y colaboradores (2010), demuestra que el fruto de *Aristotelia chilensis* y hoja de *Gigantochloa scortechinii*, *G. levis*, *G. ligulata* y *Schizotachyum zollingeri*, presentan compuestos antioxidantes, así como las fracciones de las hojas de *Piper peltatum* que muestran una capacidad antioxidante y podría ser fuente potencial de fitonutrientes con propiedades antioxidantes (Mohd et al., 2008; Puertas-Mejía, Gómez-Chabala, Rojano & Sáez-Vega, 2009).

### 3. Plantas medicinales con actividad antioxidante

En la búsqueda de actividad antioxidantes se han realizado varios estudios, según lo investigado, el primer estudio sobre la actividad antioxidantes en material vegetal es el de Mensor y colaboradores (2001), realizado en Brasil, en el cual se estudiaron distintas especies, siendo la hoja de *Platypodium elegans*, la flor y fruto de *Brillantaisia palisatii*, la hoja de *Apuleia leiocarpa*, la corteza de *Lantana trifolia*, la hoja de *Brosimum guianense* y la corteza de *Lantana cámara* las que presentaron la mayor actividad contra los radicales libres. En Paraguay, la actividad antioxidante fue estudiada en seis plantas por Velásquez y colaboradores (2003) (*Aristolochia giberti*, *Cecropia pachystachya*, *Eugenia uniflora*, *Piper fulvescens*, *Schinus weinmannifolia* y *S. terebinthifolia*), encontrando el extracto metanólico como protector contra la peroxidación lipídica enzimática.

En Canadá se estudió el rol del estrés oxidativo en la neurodegeneración, siéndola hoja de *Petroselinum sativum*, quien proporciona la mayor protección al ADN ante los radicales libres y la hoja y pasta de *Lycopersicum esculentum* quien confiere mayor protección al ADN y los lípidos, de los mismos (Cui et al., 2004).

En estudios realizados por Hinneburg y colaboradores (2005) en Finlandia, se encontró que *Ocimum basilicum*, *Laurus nobilis* y *Juniperus communis*, presentan un mayor poder de reducción de hierro.

En Europa, se han realizado estudios y entre estos se encuentra un estudio realizado en Italia sobre especies comestibles, demostrando que *Pimpinella anisum*, *Foeniculum vulgare* y *O. basilicum* poseen una alta capacidad antioxidante según Bonanni y colaboradores (2007); además en España 34 especies vegetales, demostraron que solamente la planta entera de *Lycopus europaeus*, *Melissa officinalis*, *Sylibum marianum*, *Equisetum telmateia*, *Lythrum salicaria*, *Mentha pullegium*, *Mentha piperita*, *Mentha aquatica*,

*Mentha suaveolens*, *Mentha longifolia* y la flor de *Origanum vulgare*, presentaron mayor potencial de actividad antioxidante esto según López y colaboradores (2007). Entre otras especies de plantas que presentan actividad antioxidante según Ferreira y colaboradores (2009) en Portugal, se encuentran *Hypericum undulatum*, *Melissa officinalis*, *Laurus nobilis*, *Lavandula pedunculata*, *Mentha suaveolens*, las cuales se utilizan como condimento o plantas medicinales y *Sanguisorba minor* que se utiliza como planta medicinal. En Chile, se evaluó la actividad antioxidante y su relación para la mejora de la hiperglicemia e hipertensión en plantas medicinales, presentando mayor actividad la hoja de *Piper angustifolium* y *Phyllanthus niruri*; y en té de hierbas siendo la hoja y ramitas de *Ilex paraguayensis* y *Peumus boldus*, los de mejor actividad (Gálvez, Kwon, Apostolidis & Shetty, 2010). En China, se estudiaron las semillas de papaya, encontrándose que la fracción de etil acetato presenta la mayor actividad reductora de hierro (Zhou et al., 2011).

Uno de los estudios más recientes se realizó en Sur África, en el que *Podocarpus elongatus* presenta la mayor actividad antioxidante con un 99.44% (Abdillahi, Finnie & Standen, 2011).

#### **D. Descripción del género *Piper***

*Piper* es un género que pertenece a la familia *Piperaceae*. Las especies pertenecientes a la familia *Piperaceae* frecuentemente son arbustos aromáticos, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Sus hojas son alternas, enteras a menudo lobuladas en la base, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta. Los dos géneros más grandes son *Piper* y *Peperomia*, conteniendo cada uno alrededor de 1.000 especies. *Peperomias* son en su mayoría plantas pequeñas, hierbas suculentas, epifitas a menudo; gaiteros son leñosos (Marquis, 2004).

El género *Piper* las plantas son pequeñas, y sus límites son inciertos. Presentan tallos con nudos engrosados y las inflorescencias son espigas solitarias opuestas a las hojas que están dispuestas en forma alternada. Estas plantas se encuentran en una gran variedad de hábitats, las partes vegetativas a menudo presentan aromas cuando son estrujadas (Standley & Williams, 1976).

Se caracteriza por ser arbustos o árboles más o menos leñosos, a veces con madera blanda y sub-herbácea, ocasionalmente trepadora, tallos usualmente con nudos engrosados, hojas enteras, simples alternas o lobuladas, nudosidades e inflorescencia en aumento (Marquis, 2004).

La mayor diversidad de especies de *Piper* se encuentra en el Neotrópico, donde se localizan alrededor de dos tercios de las especies descritas. Unas 300 especies son endémicas al sudeste de Asia, incluyendo las islas de las Indias Orientales y el norte de Australia. Sólo dos especies son nativas de África. La mayoría de las especies de *Piper* crecen en los bosques húmedos, cálidos y lluviosos de tierras bajas (Marquis, 2004).

Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuye propiedad analgésica, antirreumática, diurética, estimulante, digestiva, antiulcerosa, antihelmíntica y bactericida, son ampliamente utilizadas para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales y como antimicrobiano (Marquis, 2004).

En Guatemala las especies del género *Piper* crecen en las regiones cálidas, en donde están asociadas principalmente a bosques secundarios. La taxonomía de estas especies no es clara y aparentemente varias podrían agruparse en una sola especie, en la Flora de Guatemala se reconocen más de 88 especies (Standley & Williams, 1976).

Las especies de *Piper* son bastante uniformes morfológicamente, con hojas simples, alternas y tallos con agrandamiento de los ganglios. Su anatomía del tallo es inusual para

las dicotiledoneas. Muchos producen cuerpos de perlas en las hojas o tallos, o el revestimiento de los pecíolos (Marquis, 2004).

En Guatemala, se realizó un estudio en el cual se identificaron cinco especies del género *Piper* nativas de Guatemala: *P. jacquemontianum*, *P. hispidum*, *P. patulum*, *P. auritum* y *P. aduncum*. En estas especies de *Piper* se identificaron monoterpenos como componente mayoritario. Mediante el tamizaje fitoquímico se identificaron flavonoides, saponinas, alcaloides y aceite esencial en todas las especies, cumarinas únicamente en *P. auritum* y antraquinonas en muy poca cantidad en *P. auritum*, *P. aduncum*, *P. aeruginosibaccum* y *P. hispidum* (Cruz, Cáceres, Álvarez, Apel & Enríquez, 2012).

En el año 2008 se realizó una caracterización de extractos y aceites esenciales, y evaluación de la actividad biológica de hoja de *P. jacquemontianum*, *P. oradendron* y *P. umbellatum* en donde todas las muestras presentaron alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles, cumarinas y en las especies evaluadas solamente la especie *P. jacquemontianum* presentó taninos (Gómez, 2008; Cruz et al., 2012).

## **E. Fichas técnicas de especies *Piper* a estudiar**

### 1. *Piper amalago* L.

#### a. Descripción botánica

Arbusto alto y muy ramificado, de aproximadamente 1.5-3 m de alto o algunas veces hasta 6m. Pecíolos cortos, glabrosos y vaginados solamente en la base. Hojas palmatinervias, delgadas pero muy firmes y rígidas, variables en forma, lanceolado-elípticas a ovado-elípticas o redondo-ovadas, 7-14 cm de largo y 3.5-7 cm de ancho,

gradualmente o abruptamente acuminadas o largamente acuminadas, obtusas o redondeadas en la base, glabras o a veces diminutamente puberulentas en los nervios del envés. Pedúnculos delgados, de igual tamaño o incluso más grandes que el pecíolo, glabros o puberulentos. Inflorescencias delgadas en espigas solitarias, de 3-7 cm de largo o más, el raquis puberulento o hirteloso, brácteas ciliadas, algunas veces hirtelosas, estambres cuatro, anteras reniformes, fruto glabro (Standley & Williams, 1976).

b. Hábitat y distribución

Matorrales húmedos o lluviosos o bosques mixtos, bosques húmedos y premontanos o bosques secos, en sitios parcialmente sombreados. Se encuentra a una altura de 2,600 m o menos. Se reporta para el sur de México, Guatemala (Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Huehuetenango), Belice, Jamaica y el resto de Centroamérica hasta Suramérica (Standley & Steyemark, 1952).

c. Usos Medicinales

Utilizado para el dolor de cuerpo, dolor de estómago, dolor de pecho, tos, detener hemorragias nasales, mordeduras de serpientes, antiabortivo, enfermedades psicológicas y sus síntomas, dismenorrea, edema, fiebre, antiveneno, vértigo; y como repelente de serpientes (Dominguez, & Alcorn, 1985).

d. Bioactividad demostrada

Posee actividad moluscocida, antiinflamatoria, antihipertensiva, vasoconstrictora y espasmolítica (Dominguez & Alcorn, 1985; Dominguez, Verde, Sucar & Treviño, 1986).

e. Fitoquímica

Sus hojas contienen alcaloides, terpenos, esteroides, ácido aminobutírico, dopamina y ácido cinámico (Standley & Steyemark, 1952; Dominguez & Alcorn, 1985).



## 2. *Piper auritum* HBK.

### a. Descripción botánica

Planta gruesa, algo suculenta, poco ramificado o raramente leñosas abajo y cada vez en forma de árbol, comúnmente alrededor de 2 m de altura, pero a veces hasta 6 m de altura, las ramas son gruesas, escasamente pubescentes o; estigma corto o alargado, pecíolos gruesos, los pecíolos alados en general, más o menos dilatados y juntos en la base, láminas foliares grandes, delgada y suave, por lo general seco verde amarillento brillante, ampliamente ovadas u oblongo-aovadas, hasta el 60 cm de largo y 35 cm de ancho, pero por lo general mucho más pequeñas, agudas o acuminadas abruptamente cortas, estrechas y profundamente cordadas en la base, los lóbulos basales son redondeados, uno de ellos extiende 1.5-3 cm inferior en la costa que la otra, ligeramente más pálido debajo (Standley & Steyemark, 1952).

### b. Hábitat y distribución

Se encuentra en bosquesillos o bosques húmedos a 1800 m o menores elevaciones. Se encuentra en Petén, Alta Verapaz, Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Sur de México, desde Honduras y El Salvador hasta Panamá; Colombia, descrita originalmente en México (García, Leyva, Martínez & Stashenko, 2007).

### c. Usos medicinales

Los aceites esenciales son usados como agentes carminativos, estimulantes, diuréticos y antireumáticos. Las hojas de esta especie se usa en forma tópica, para diversas afecciones como: dolor de cabeza y dolor abdominal, en decocción se usa para tratar la fiebre (Mesa, Toro, Cardona & Blair, 2012; Sánchez et al., 2009).

d. Bioactividad demostrada

El extracto de los tallos presentó toxicidad citotóxica indicando la presencia de compuestos de interés farmacológico en la búsqueda de anticancerígenos. El aceite esencial presenta baja actividad antioxidante comparado con el efecto protector de la vitamina, esta leve actividad antioxidantes se explica debido a la presencia de hidrógenos arílicos (García et al., 2007).

e. Fitoquímica

Los compuestos encontrados en mayor porcentaje en el aceite esencial de hojas e inflorescencias, son de tipo aromático, sustituidos con grupos alquilos y alilo, además se observa alto contenido de compuestos oxigenados (García et al., 2007).

3. *Piper hispidum* Swartz

a. Descripción botánica

Arbustos profusamente ramificados de 1-4 m de alto. Hojas pinnatinervias, asimétricas, elíptico-ovadas, ovadas o ampliamente ovadas, ocasionalmente obovadas, 11-18 cm de largo y 6-8 cm de ancho, color verde claro, nodoso, áspero, ramos jóvenes pubescentes. Hojas con ápice acuminado, el lado más largo obtuso, el más corto cuneado, ocasionalmente cuneadas sobre ambos lados, densamente punteado-glandulares en ambas superficies, particularmente en el envés, verde nítidas en ambas superficies, verde cafés y opacas en ambas superficies cuando secas, tardíamente rugosas, estrigosas o hispídas en la haz, hispído adpresas en el envés. Pecíolos 0.3-0.7 cm de largo, densamente estrigosos, con un desarrollo estipular prominente, 6-8 mm de largo, caduco. Inflorescencias erectas en todos los estadios, blanco-amarillentas en la anthesis, verde pálidas en fruto. Pedúnculo 0.5-0.7 cm de largo, hispído-estrigoso, glabrescente. Raquis 6-7.5 cm de largo, glabro. Brácteas

florales triangulares, 0.2 mm de ancho, dorsal y marginalmente fimbriadas. Flores densamente agrupadas en el raquis formando bandas alrededor de la espiga, sésiles. Filamentos tan largos como las anteras, éstas con dehiscencia horizontal. Frutos ovoides, 0.6-0.8 mm de largo, comprimidos lateralmente, apicalmente obtusos, estrigosos, granulados, café oscuros cuando secos. Raíces adventicias con estructura primaria con epidermis uniestratificada y corteza parenquimatosa la cual contiene ideoblastos con material lipofílico (Standley & Steyermark, 1952).

b. Hábitat y distribución

Frecuente en bosques húmedos, lluviosos o secos, bosques premontanos. Común en sitios expuestos o en sombrío de bosques secundarios. Se encuentra a 1,900 m o más bajo; más comúnmente debajo de los 1,000 m. Se reporta para el sur de México (Veracruz), Guatemala (Peten, Alta Verapaz, Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Sacatepéquez, Chimaltenango, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos, Quiché, Huehuetenango), Belice, el Caribe y toda Centroamérica hasta Suramérica (Standley & Steyermark, 1952).

c. Usos medicinales

La infusión de hojas se usa para regular la menstruación y proteger de caries la dentadura. En Perú los Achuales (nativos), del río Huasaga mastican las hojas para ennegrecer los dientes y protegerlos de la caries. Los Boras (nativos del Perú) usan un baño de las hojas para tratar las llagas en la boca de los niños. Además es utilizado como repelente de insectos, y para las picaduras de insectos. La hoja es astringente, cicatrizante y tratamiento de las úlceras (Standley & Steyermark, 1952).

#### d. Bioactividad demostrada

Posee actividad insecticida (Santos et al., 2010), además posee efecto antimalarico y antipirético (Jenett-Siems, Mockenhaupt, Bienrzle, Gupta & Eich, 2002).

#### e. Fitoquímica

Contiene alcaloides, saponinas, esteroides, taninos flavónicos, flavonoides, flavanonas, aceites esenciales, fenoles, esteroles, diterpenos, triterpenos, azúcares reductores y glicósidos, guayanólidos, eupatorina, eupatilina, cumarinas, emodina, antracenos, ácidos y vitamina K y compuestos reductores, vaticina, éter matíxico, cínelo, ácido tartárico, chalconas. El aceite esencial contiene ácido benzoico, acetato de borneol,  $\gamma$ -cadineno, canfeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -guaiano, mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pinenos, pinostrobin, 3,7metil-1,3,6octatrieno, linalool, biciclo-heptan-2-canfor,  $\beta$ -selineno, 2-5-6trimetil-1,3,6heptatrieno,2,4diisopropenil-1-metil-1-vinilo, biciclogermacrano,  $\alpha$ -copaeno, 1,6,10 dodecatrien-3-ol, (-)-espatulenol,  $\alpha$ -guaiano,  $\beta$ -sesquifelandreno (Cruz et al., 2012; Plazas, Cuca & Delgado, 2008; Dias dos Santos, Lima, Guimara & Coelh, 2001).

### 4. *Piper jacquemontianum* Kunth

#### a. Descripción botánica

Arbusto de generalmente 2 m de alto, en ocasiones es un árbol pequeño, las ramas jóvenes son densamente hispídas o hirsutas, pecíolos de 1cm de largo o menos, algunas veces más largos en las hojas inferiores, grueso, densamente hispido o raramente glabroso; muy desigual en la base y más o menos oblicuo, usualmente redondeado o más o menos cordado en un lado y obtuso en el otro, un lado mucho más decurrente que el otro, grueso y firme, muy lustroso en el haz y con frecuencia lustroso en el envés, ligeramente más pálido

en el envés, verde grisáceo o en ocasiones negruzco, glabroso en el haz, suave al tacto, hispida debajo, especialmente en los nervios, con pelos pequeños, firme al tacto (Standley & Williams, 1976).

b. Hábitat y distribución

Se encuentra en bosquecillos húmedos y secos, algunas veces en bosques de pinos a 1600 m o elevaciones menores. Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Guatemala, Chimaltenango, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez y algunas regiones de Suramérica (Standley & Williams, 1976).

c. Usos medicinales

El aceite esencial de esta especie posee propiedades antibacterianas y actividad contra insectos y moluscos. La infusión preparada con las hojas y decocción de la raíz se utiliza para tratamiento de diarrea, disentería, vómitos, úlceras, así como para controlar hemorragias (Badii, Garza, Landeros & Quiroz, 2006).

d. Bioactividad demostrada

El extracto etanólico tiene una amplia actividad contra microorganismos a dosis <1 mg/mL; en el tamizaje contra protozoos se encontró potente actividad contra *Plasmodium falciparum* (11 µg/mL), *Trypanosoma cruzi* (12 µg/mL) y *Leishmania mexicana* (24 µg/mL). Del extracto etanólico se prepararon particiones con hexano, cloroformo y acetato de etilo y se determinó la MIC (concentración mínima inhibitoria), encontrándose que la partición hexánica es activa contra *P. falciparum* (14 µg/mL), *T. cruzi* (24 µg/mL), *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis* (0.125 mg/mL), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (0.25 mg/mL) y *Candida albicans* (0.50 mg/mL). La partición clorofórmica fue activa contra *T. cruzi* (8 µg/mL), *P. falciparum* (11 µg/mL), *B. subtilis* y *C. albicans* (0.0625 mg/mL), *M. smegmatis* (0.125 mg/mL), y *S. aureus* (0.5 mg/mL). La

partición con acetato de etilo fue activa contra *P. falciparum* y *T. cruzi* (22 µg/mL), *B. subtilis* y *C. albicans* (0.0625 mg/mL), y *S. aureus* y *M. smegmatis* (0.50 mg/mL). El extracto diclorometánico tiene actividad contra *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *Cryptococcus neoformans*. Los extractos diclorometánicos y metanólicos presentaron actividad contra *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *M. smegmatis* (Gómez, 2008).

#### e. Fitoquímica

En la hoja se encuentran presentes alcaloides. Se identificaron linalol, E-nerolidol y  $\alpha$ -pineno (Cruz et al., 2011).

### 5. *Piper oradendron* Trelease & Standley

#### a. Descripción Botánica

Arbusto de 1-2.5 m de altura, las brácteas tenues, densamente hispídas con pelos cortos, esparcidos en la parte superior de los entrenudos cortos; peciolos delgados, de 1-2 cm de longitud, no alados, hispídos dilatados en la base; las láminas de las hojas son delgadas, usualmente verdes o verde oscuro cuando se secan, densamente pelúcidas puntuadas, tenuemente lustrosas, ovadas o elípticas-ovadas, casi siempre de 13-18 cm de longitud y 6- 9 cm de ancho, abruptamente acuminadas, oblicuas y no uniformes de forma conspicua en la base, usualmente acusada de un lado y obtusa o hasta redondeada en el otro, escabrosa arriba, en su mayoría glabra, generalmente suave al tacto, peninervada de tres a cuatro nervios de cada lado, ascendiendo en un ángulo menor de 45°, poco arqueados y casi rectos, pedúnculos opuestos a las hojas, robustas, aproximadamente 6mm de longitud, hispído o glabro; espigas delgadas, las inmaduras de 5-6 cm de longitud y 2 mm de grosor; brácteas densamente pubescentes (Standley & Williams, 1976).

b. Hábitat y distribución

Se encuentra en bosques mixtos húmedos o secos a 1,200 m o menor elevación; endémica de Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Retalhuleu y San Marcos (Standley & Williams, 1976).

c. Usos medicinales

No hay información disponible.

d. Bioactividad demostrada

El extracto metanólico de las hojas tiene actividad antioxidante, y en las raíces contiene alta cantidad de piperina (Cáceres et al., 2012).

e. Fitoquímica

Presenta alta cantidad de flavonoides en las hojas (Cáceres et al., 2012).

6. *Piper psilorhachis* C. DC.

a. Descripción botánica

Arbusto de tamaño mediano o un pequeño árbol, raras veces mide 7.5 m de alto, usualmente es mucho más bajo, glabro en todo. Hojas palmatinervias en pecíolos delgados de 1cm de largo o usualmente más cortos, frecuentemente se ennegrecen cuando están secos, lanceolado-ovadas o lanceolado-elípticas, principalmente 7-10.5 cm de largo y 3-4.5 cm de ancho, es más bien abrupta y estrechamente largo acuminadas, obtusas y algo ligeramente desiguales en la base, cinco nervios, escasamente pálidas en el envés, las venas prominulosas, muy laxamente reticuladas. Pedúnculos casi igualando los pecíolos o a veces más largos. Espigas delgadas, 5-10 cm de largo, apenas 3 mm de grueso, el raquis glabro, las brácteas diminutas, ovadas, glabras. Estambres 5-6. Frutos oblongos, 5-6 mm de largo o

menos al madurar, muy diminutamente puberulentas. Estigmas 3, sésiles, diminutas (Standley & Steyermark, 1952).

b. Hábitat y distribución

Bosques mixtos húmedos o lluviosos. El rango altitudinal está entre los 1,800 m hasta altitudes cercanas al nivel del mar. Se ha descrito desde México (Tabasco), Belice, Guatemala (Petén, Alta Verapaz, Escuintla, Guatemala, San Marcos), El Salvador, Honduras hasta Costa Rica (Standley & Steyermark, 1952).

c. Usos medicinales

No hay información disponible.

d. Bioactividad demostrada

Presenta importante actividad antioxidante, evaluado por fenoles totales, DPPH y ABTS (Cáceres et al., 2012).

e. Fitoquímica

No hay información disponible.

7. *Piper retalhuleuense* Trelease & Standley

a. Descripción botánica

Planta herbácea pero a menudo leñosa de la base, 1.5 m de altura o más pequeña, enraizado en los nudos inferiores, las ramas son verde pálidas, estriadas, gruesas, fuertemente nodosas; peciolo de 1.5-2.5 cm de largo, hirsuto corto, invaginados únicamente en la base; hojas delgadas y flácidas, verdes cuando se secan, pueden ser abruptamente puntiagudas o acuminadas con punta obtusa, profunda y estrechamente cordadas en la base, pálidas al envés, palmeada con siete nervios, levemente tersa; pedúnculos opuestos a las hojas de 7-10 mm de largo, hispido cortos o glabros; espigas



erectas de 1.5 -3.5 cm de largo, 3 mm de ancho en el fruto; frutos ovales y globosos, 1.5mm de largo, oscuro y granular (Standley & Williams, 1976).

b. Hábitat y distribución

Se encuentran en bosquecillos húmedos o secos a 325 m o elevaciones menores; endémicas de Santa Rosa, Retalhuleu (Standley & Williams, 1976).

c. Usos medicinales

No hay información disponible.

d. Bioactividad demostradas

No hay información disponible.

e. Fitoquímica

El aceite esencial contiene sesquiterpeno (Cruz et al., 2012).

8. *Piper sempervirens* (Trelease) Lundell

a. Descripción botánica

Arbusto alto y delgado, comúnmente 1.5-5 m de alto. El tronco algunas veces 15 cm de diámetro, glabro en todo. Hojas palmatinervias (3-5 nervios) en pecíolos delgados de 8 mm de largo, cartáceas y rígidas, usualmente muy lustrosas, verde grisáceo cuando están secas, elípticas u oblongo-elípticas, principalmente 6-9 cm de largo y 3-4.5 cm de ancho, abruptamente largo acuminadas, agudas y levemente desiguales en la base, epuntadas, los nervios terminan a una corta distancia debajo del ápice, concoloras, las venas preminulosas y estrechamente reticuladas en ambas superficies. Pedúnculos de 14 mm de largo o más cortos, laxos. Inflorescencias pediceladas en racimos terminales, 1.5-4 cm de largo, los pedicelos divaricados, casi igualando a las flores. Frutos ovoides, un poco más de 2 mm de largo (Standley & Steyermark, 1952, Véliz et al, 2006).

b. Hábitat y distribución

Arbusto, ocasional en bosques altos y bosques de tierras bajas húmedos o lluviosos. Bosques mixtos. Habita en sitios o valles, montañas de piedra caliza. Se encuentra a 300 m o menores. Se reporta para el sur de México, Guatemala (Petén y Alta Verapaz), Belice y El Salvador (Standley & Steyermark, 1952).

c. Usos medicinales

Utilizada en decocción para curar heridas y mordeduras de serpientes (Cruz et al., 2005).

d. Bioactividad demostrada

No hay información disponible.

e. Fitoquímica

En las hojas se detectó la presencia de alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles y cumarinas (Cruz et al., 2005).

9. *Piper umbellatum* L.

a. Descripción botánica

Planta erecta, usualmente de 1-1.5 m de altura, con brácteas esparcidas, herbácea pero usualmente leñosa por debajo, las brácteas jóvenes densamente villosas y pilosas; peciolo de 20 cm de longitud o menor, invaginada en parte de su longitud; las láminas de las hojas son delgadas y flácidas, verdes, ovadas-orbiculares, casi siempre entre 20-30 cm de longitud y de igual mayor amplitud, acuminadas o abruptamente poco acuminadas, profunda y usualmente cordada en la base de forma angosta, con lóbulos basales redondeados, verdes en la superficie superior, glabras a densamente villosas. Pálido por debajo, pubescencia esparcida o densa, pelúcida-puntuada, nervación palmeada. Presenta

aproximadamente 13 nervios; espigas verde pálido o blancuzcos, algunas veces color crema, de 9-15 cm de longitud y aproximadamente 4 mm de grosor, con pedúnculo corto, umbelado en los bordes de los pedúnculos axilares (Standley & Williams, 1976).

b. Hábitat y distribución

Se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Escuintla, Guatemala, Chimaltenango, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos; desde el Sur de México a Sur América. Se encuentra en bosques húmedos a 1,500 m o menores elevaciones sobre el nivel del mar (Standley & Williams, 1976).

c. Usos medicinales

Las hojas se utilizan para limpieza de la piel, se reporta que el caldo hecho de caracoles y hojas se utiliza para incrementar el flujo de la leche, utilizada para el tratamiento de arteroesclerosis, lipemia, cólicos, flatulencia, fiebre, enfermedades relacionadas con el aparato reproductor femenino, laxante, malaria, granos, enfermedades psiquiátricas (calmante), quemaduras, sanar heridas, raspones, esguinces, irritaciones de la piel, diarrea, acelerar el parto, dolor de cuerpo, tiene efecto antiabortivo y se utiliza como pesticida natural (Cruz et al., 2012; Agbor, Vinson, Sortino & Johnson, 2012).

d. Bioactividad demostrada

El extracto diclorometánico de la hoja tiene actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *M. smegmatis*. Sus hojas poseen actividad antiprotozoaria contra *Leishmania* sp y *Plasmodium* sp. El extracto acuoso de sus hojas posee actividad analgésica, hipotérmica, reducción de la actividad espontánea y efecto tranquilizante así como también se ha demostrado actividad antioxidante contra radicales libres tales como DPPH, superóxido, radicales hidroxilo, óxido nítrico. Presenta alta actividad antimalárica

contra *Trichophyton longifusus* así como actividad potencial citotoxicidad y antihumoral (Roersch, 2010; Hammer, Carson & Riley, 1999; Agbor, Vinson, Oben & Ngogang, 2007).

e. Fitoquímica

Compuestos mayoritarios del aceite esencial E-nerolidol (23.4%), germacrano D (17.4%) y  $\beta$ -cariofileno (8.5%) (Martins, Salgueiro, Vila, Tomi, Canäigueral, Casanova & Adzet, 1998).

10. *Piper variable* C. DC. ex Donn. Smith

a. Descripción botánica

Arbusto erecto o árbol pequeño, usualmente de 1-3 m de alto, escasamente ramificado, glabro en todo o casi en todo. Pecíolos gruesos, 1.5-5 cm de largo o algunas veces 10 cm o más, vaginados solamente en la base. Hojas epuntadas o levemente epuntadas, más bien gruesas y firmes, usualmente no todas se ennegrecen cuando están secas, ampliamente ovado-cordadas a ovado-orbiculares, principalmente 13-24 cm de largo y 7-18 cm de ancho, abruptamente agudas o acuminadas, superficial o profundamente cordadas en la base, o en las hojas superiores truncadas o redondeadas, con lóbulos basales ampliamente redondeados. Las venas apenas prominulosas, muy laxamente reticuladas, no conspicuas. Pedúnculos opuestos a las hojas, gruesas, principalmente 1-1.5 cm de largo. Espigas blanquecinas, largas y delgadas, colgantes o recurvadas, comúnmente 9-18 cm de largo, 3-4 mm de grueso, muy obtusas. Brácteas glabras. Estambres tres. Fruto pequeño y glabro (Standley & Williams, 1976).

b. Hábitat y distribución

Crece en bosques húmedos o lluviosos; algunas veces en lugares secos. Se reporta desde los 1,600m o aún más bajo. Se ha descrito en México (Tabasco y Veracruz);

Guatemala (Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Escuintla, Guatemala, Retalhuleu, Quetzaltenango, San Marcos); Belice y Honduras (Standley & Williams, 1976).

c. Usos medicinales

Popularmente usado para el tratamiento de la anemia y dolor de cuerpo (Standley & Williams, 1976).

d. Bioactividad demostrada

El extracto diclorometánico posee actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *M. smegmatis* (Standley & Williams, 1976).

e. Fitoquímica

Presenta un alto rendimiento de aceite esencial, contiene alcanfor como principal componente (Cruz et al., 2012).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El género *Piper* comprende un elevado número de especies y presenta una extensa aplicación etnobotánica. Estudios previos han mostrado que dichas especies son utilizadas con fines etnomédicos, pudiendo poseer potencial en la medicina natural por sus variadas acciones fisiológicas.

En la presente investigación se seleccionaron diez especies (*P. amalago*, *P. auritum*, *P. hispidum*, *P. Jacquemontianum*, *P. oradendron*, *P. psilorhachis*, *P. retalhuleuense*, *P. sempervirens*, *P. umbellatum*, y *P. variable*) que demostraron una importante actividad antioxidante en estudios previos mediante técnicas de ABTS, DPPH y fenoles totales, por lo que se pretende evaluar este potencial mediante una cuarta técnica de reducción de hierro (FRAP). Los antioxidantes mejoran los procesos patológicos en enfermedades degenerativas crónicas, mediante la reducción de especies reactivas de oxígeno.

La combinación de un efecto antioxidante y la disminución de la enzima tirosinasa tienen un alto valor medicinal ya que al disminuir los efectos oxidativos del envejecimiento y la hiperpigmentación por la acumulación de tirosinasa, se produce una mejora cosmética.

Algunas enfermedades degenerativas como la infección gástrica por *H. pylori*, produce la acumulación de especies reactivas de oxígeno resultado de un daño prolongado, así como niveles importantes de ureasa que provienen del metabolismo bacteriano, cambiando el pH de la bolsa gástrica. Un efecto antioxidante e inhibidor de la ureasa ayudan a disminuir los efectos de estas infecciones y la severidad del cuadro clínico.

En Guatemala no se han realizado estudios que evalúen la actividad inhibidora de tirosinasa y ureasa, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar esta actividad para contribuir al desarrollo agroindustrial y medicinal de productos naturales.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Evaluar por bioensayos la actividad antitirosinasa, antiureasa, antioxidante de extractos vegetales de diez especies del género *Piper* nativas de Mesoamérica de importancia médica, cosmética y conservación de alimentos.

### B. Específicos

1. Establecer procedimientos para evaluar la actividad antitirosinasa, antiureasa y antioxidante en plantas.
2. Determinar la actividad antitirosinasa en especies del género *Piper* seleccionadas.
3. Determinar la actividad inhibidora de la enzima ureasa, en especies del género *Piper* seleccionadas.
4. Comprobar el poder antioxidante en especies del género *Piper*, por medio de la reducción del hierro.

## **VI. HIPÓTESIS**

Por lo menos uno de los extractos diclorometánicos o metanólicos del género *Piper* presentan actividad antitirosinasa, antiureasa y antioxidante.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de trabajo y muestra

#### 1. Universo

Plantas del género *Piper* nativas de la región Mesoamericana.

#### 2. Muestra

Diez extractos diclometánicos y metanólicos de las hojas de plantas nativas del género *Piper*: *P. amalago*, *P. auritum*, *P. hispidum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron*, *P. psilorhachis*, *P. retalhuleuense*, *P. sempervirens*, *P. umbellatum* y *P. variabile*. Escogidos en base a criterios de disponibilidad geográfica, potencial comercial en los mercados nacionales y la inexistencia de estudios previos en Guatemala a cerca de su capacidad antioxidante, antitirosinasa y antiureasa.

### B. Recursos

#### 1. Humanos

a. Seminaristas: Br. Paola Alejandrina Sierra Illescas, Br. Andrea del Carmen Orellana Urrutia, Br. Ligia Izabel Sampuel Guzmán, Br. Hirma Fabiana Almeda Tablas y Br. Laura María Astorga Domínguez.

b. Asesor: Lic. Armando Cáceres.

## 2. Institucionales

- a. Laboratorio de Bioensayos, Departamento de Citohistología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- b. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales – LIPRONAT, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- c. Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA, S.A.
- d. Financiamiento del proyecto FODECYT 27-2011

## C. Materiales y Métodos

Se realizaron procedimientos estándar establecidos en el laboratorio de bioensayos de departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

### 1. Materiales

- Agitador de vidrio
- Algodón
- Balón aforado (10, 50 y 100 mL)
- Beakers de vidrio
- Bolsas negra
- Bolsas negras
- Bolsas herméticas.
- Cristalizadores
- Cronómetro

- Erlenmeyer de vidrio
- Espátula
- Extractos de plantas del género *Piper*
- Guantes de jardinería
- Guantes de jardinería
- Micropipetas de 100-1000  $\mu$ l
- Papel encerado
- Papel filtro
- Papel Kraft
- Papel prensa
- Placa de micro titulación de 96 pocillos con fondo plano
- Placa para cromatografía fina de sílice 60F<sub>254</sub>
- Recipientes plásticos
- Tamiz
- Termómetro en Centígrados.
- Tijeras de jardinería
- Tubos de ensayo

## 2. Equipo

- Asperjador
- Balanza analítica
- Balanza de humedad
- Cámara de vidrio
- Centrífuga

- Desecadora
- Equipo de enfriamiento tipo Chiller
- Espectrofotómetro
- Horno de flujo horizontal
- Incubadora
- Percolador de vidrio o de acero inoxidable
- Rotavapor R- 3000, R-440
- Transporte vehicular

### 3. Reactivos

- Acetona 99%
- Ácido ascórbico
- Ácido kójico
- Ácido tricloroacético 10%
- Agua Destilada
- Cloroformo
- Cloruro Férrico 0.1%
- Diclometano absoluto
- Dimetilsulfoxido (DMSO)
- Éter de petróleo
- Ferrocianuro de potasio al 1%
- Hidroxiciclohexanona
- L-tirosina
- Metanol absoluto

- Rojo de fenol
- Silicon
- Solución L-tirosinasa
- Tampón fosfato de potasio
- Tirosinasa (333 U/mL)
- Urea
- Ureasa (Merck)

#### 4. Procedimiento

##### a. Recolección y desecación de especies *Piper*.

##### i. Recolección

Se recolectó el material vegetal en su área de crecimiento silvestre o bajo manejo de ecoparcela el Kakawatal (Samayac, Suchitepéquez). El material vegetal, constituido por hojas, se colocó en bolsas negras para transportarlas hacia la capital.

##### ii. Desecación de especies *Piper*

- Se colocaron las hojas dentro del horno de flujo horizontal, sin sobreponerlas demasiado.
- Se secaron durante 48 hrs. (no quemarlas) a 40°C.
- Se determinó el porcentaje de humedad de la planta seca en el lector de humedad. La humedad deberá ser menor del 10% caso contrario secar nuevamente.
- Se determinó el porcentaje de rendimiento:

$$\text{Porcentaje rendimiento} = (\text{peso planta seca} / \text{peso planta fresca}) \times 100.$$

- Se guardó las plantas secas en bolsas negras e identificaron con nombre.

iii. Tamizaje

- Se colocaron bandejas con presas en el suelo colocando el tamiz sobre las mismas.
- Se tamizó el material vegetal sobre el tamiz.
- Se guardó la droga vegetal en bolsas herméticas.

b. Obtención de extractos diclorometanólicos y metanólicos por la técnica de percolación (Sharapin, 2000).

- Se pesó 200 g de droga vegetal en la balanza analítica.
- Se colocó papel filtro y algodón en la parte inferior del percolador previamente limpio y seco.
- Se transfirió el material vegetal al percolador y agregó 2.0 L de diclorometano a manera de cubrir toda la muestra y tapar con aluminio.
- Se dejó reposar 24 hrs. para que se llevara a cabo la extracción.
- Se abrió la llave inferior del percolador y se dejó gotear a una velocidad moderada, recolectando el líquido en un Erlenmeyer.
- Se añadió disolvente extra, hasta recolectar en el Erlenmeyer la cantidad de disolvente agregada al inicio.
- Se colocó todo el líquido obtenido dentro de un balón aforado y éste se colocó en un rotavapor, se encendió el baño de María y se llevó la temperatura a  $40 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Se engrasó con silicón todas las partes esmeriladas y se armó el rotavapor según el instructivo específico.
- Se succionó la solución obtenida del percolador.

- Se inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente (diclorometano) hasta llevar a la consistencia semisólida. En caso de metanol, se conectó la bomba de vacío e inició la destilación del extracto con recuperación del disolvente hasta llevar a la consistencia semisólida (repetir el procedimiento cuantas lavadas sean necesarias).
- Se vertió el extracto concentrado en un cristizador de vidrio debidamente tarado y rotulado.
- Se colocó en una desecadora durante 7-15 días.
- Cuando el extracto tuvo consistencia sólida, se trasvasó a viales debidamente tarados y rotulados.
- Se calculó el rendimiento del extracto y guardó en viales o recipientes herméticos a refrigeración.
- Se repitió la misma operación utilizando metanol.

c. Evaluación de la actividad antitirosinasa

i. Determinación actividad antitirosinasa por TLC (Momtaz et al., 2008).

- Se preparó una solución de L-tirosinasa (3333 U/mL) disolviendo 2 mg en 10 mL de tampón de fosfato (pH 6.5, 50 mM).
- Se preparó el sustrato disolviendo 3.6 mg de solución L-tirosina en 10 mL de tampón de fosfato (pH 6.5, 50 mM).
- El extracto de metanol se preparó disolviendo 20 mg en 50  $\mu$ L de DMSO y 950  $\mu$ L de acetona.
- El extracto de diclorometano se preparó disolviendo 20 mg en 1 mL de acetona.

- El control positivo se preparó disolviendo 1 mg de ácido kójico en 10 mL de agua desmineralizada.
- Se agrego 10  $\mu$ L de extractos disueltos en diclorometano y/o metanol en placas de silica gel y se dejó secar.
- Se sometieron las placas a la cámara cromatográfica previamente saturada con (acetona: metanol 1:49) y se dejaron eluir.
- Se removieron de la fase móvil las placas y se dejó secar.
- Se roció la placa con L-tirosina como sustrato (2 mM) se incubó a 25°C por 10 min.
- Se roció la placa con la solución de L-tirosinasa se incubó a 25°C por 30 min.
- Se observó la coloración gris-purpura y zonas claras de inhibición de la enzima L-tirosinasa, indicando los compuestos activos en los extractos.

ii. Determinación actividad antitirosinasa por espectrofotometría (Momtaz et al., 2008; Chiari et al., 2010).

- Se disolvió 0.20 mg de L-tirosinasa en 10 mL de tampón de fosfatos (pH 6.5, 50 mM)
- Se disolvió 20 mg de extractos y compuestos purificados en DMSO hasta obtener concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ g/mL, esta solución madre se diluyó luego en 600  $\mu$ g/mL en amortiguador de fosfato (pH 6.5, 50 mM).
- Se utilizó como control positivo ácido kójico (20  $\mu$ g/mL).
- Se combinó 70  $\mu$ L de extractos y estándar con 30  $\mu$ L de tirosinasa por triplicado en una placa de microtitulación de 96 pocillos.
- Se incubó a 37°C por 60 min.
- Se añadió a la mezcla de reacción 110  $\mu$ L del sustrato (2 mM L-tirosina).



- Se incubó a 37°C por 15 min.
- Se midió el cambio de absorbancia a 492 nm.
- El porcentaje de inhibición de la enzima se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = [(B-S)/B] \times 100$$

Donde B y S son las absorbancias del blanco y las muestras respectivamente.

- Se calculó la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>).
- d. Evaluación cualitativa de la actividad inhibidora de ureasa.
- i. Cromatografía de capa fina (TLC) con rojo de fenol (Shi et al., 2003).
- Se preparó fase móvil, cloroformo: metano (200:1), y se dejó reposar mínimo 30 min.
  - Se realizó disolución de 0.1 g de extracto en 5 mL de metanol.
  - Se realizó el procedimiento anterior con 5 mL de diclorometano.
  - Se colocó 10 µL de cada extracto en placa para cromatografía.
  - Se colocó hidrociclohexanona.
  - Se rocío ureasa uniformemente, en la placa se incubó 2 hrs.
  - a 25°C.
  - Se colocó en cámara cromatografía hasta saturar la placa con cloroformo: metanol.
  - Se sacó la placa y sin dejar secar se rocío solución buffer de fosfatos (pH 6.8 100 mM), urea (500 mM) y rojo de fenol (0.002%) de manera uniforme.
  - Se observó la presencia de puntos blanco en la placa, luego de una hora lo que evidencia inhibición de la enzima.

ii. Determinación cuantitativa de la inhibición de ureasa por método espectrofotometría (Tanaka, 2003).

- Se mezcló 25  $\mu$ L de ureasa con 25  $\mu$ L de tampón se incubó por 2 hrs. a temperatura ambiente. Colocándolos en placas para análisis.
- Se agregó 0.2 mL reactivo A (100 mmol/L de amortiguador de fosfatos, 500 mmol/L de urea y 0.002 % rojo de fenol).
- Se incubó a 37°C.
- Se determinó el tiempo de incubación usando como control positivo la ureasa aproximadamente 3 hrs. primero por el viraje de color y luego por el tiempo en que el pH cambia 6.8 a 7.7, este cambio de pH se da por el aumento de la concentración de carbonato de amonio formado por la reacción de la ureasa, esta concentración se cuantifico con un espectrofotómetro a 630 nm.
- Se repitieron los pasos uno, dos y tres, agregando 10  $\mu$ L de extracto. Luego de determinado el tiempo de acción de la ureasa.
- Se colocó controles positivos: hidroxiciclohexanona.
- Se realizó una medición de concentración de carbonato de amonio, con espectrofotómetro a 630 nm.

e. Evaluación de la actividad antioxidante (Kosem, Han & Moongkarndi, 2007; Lock, 1988; Myoda, 2010)

i. Poder reductor del hierro FRAP

- 1 mL del extracto, se mezcló con 1 mL tampón de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y con 1 mL ferricianuro de potasio (1%).

- Se incubó a 50°C durante 20 min.
- Se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético (10% p/v) a la mezcla reaccionante.
- Se centrifugó 10 min a 3000 rpm.
- Se mezcló 2 mL de sobrenadante con 2 mL de agua destilada.
- Se agregó 0.5 mL de cloruro férrico (0.1%).
- Se incubó 2 min con agitación constante.
- Se midió por espectrofotometría a 700 nm. El incremento de absorbancia es proporcional a la concentración de antioxidante presente.
- Se utilizó ácido ascórbico (15 µg/mL) como referencia.

#### **D. Diseño de la investigación**

##### 1. Tipo de Estudio

Se realizó un estudio de diseño cuasi-experimental (sin aleatorización).

##### 2. Variables

###### a. Independientes

i. Las diez especies de *Piper* en extractos diclorometánicos y metanólicos.

###### b. Dependientes

i. Actividad antitirosinasa y antiureasa detectada por medio de ensayos cualitativos y cuantitativos.

###### - Método Cualitativo

Para la técnica de TLC para la inhibición de tirosinasa y ureasa se utilizó como estándar ácido kójico y omeprazol respectivamente; se realizó una carga de 5 µL del control y dos cargas de 5 µL de los extractos diclorometánicos y metanólicos obteniendo

una concentración de 20 mg/mL, realizando el proceso por quintuplicado en placas de sílica gel.

- Método Cuantitativo

Para el porcentaje de inhibición de la actividad tirosinasa y ureasa se realizó una serie de diferentes concentraciones del control, ácido kójico y omeprazol respectivamente: 10, 25, 50, 75 y 100 µg/mL, se realizó por quintuplicado cada prueba en tres diferentes corridas, se realizó una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta, hasta obtener un valor de  $r^2$  entre 0.95 a 0.99. Se realizó un promedio de los datos obtenidos de cada concentración, se registraron los resultados de la curva, a partir de esto se calculó el porcentaje de inhibición de la absorbancia y de mediante la curva, la concentración. Calculándolo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} * 100 = \% \text{ Absorbancia.}$$

Se graficaron los datos de % inhibición (eje Y) y concentración del extracto (eje X).

ii. Actividad antioxidante detectada por medio de método cuantitativo.

- Método Cuantitativo (Macrométrico)

En la técnica de reducción de hierro se realizó la curva del ácido ascórbico hasta obtener un  $r^2 = 0.9907$  para posteriormente obtener los microequivalentes presentes en la plantas. Cada prueba se realizó por quintuplicado, cumpliendo con lo requerido para un análisis estadístico confiable. Cada corrida fue validada verificando que las absorbancias obtenidas en el estándar daban como resultado un valor cercano a la concentración conocida.

### 3. Validez de los métodos

- Se realizaron curvas estándar de los compuestos sintéticos con actividad inhibidora de la tirosinasa usando como referencia ácido kójico, revelado con L-tirosina y L-tirosinasa.
- Se realizaron curvas estándar de los compuestos sintéticos con actividad inhibidora de la ureasa usando como referencia hidroxiciclohexanona, revelado con rojo de fenol.
- Se realizaron curvas estándar de los compuestos sintéticos con actividad antioxidante usando como referencia ácido ascórbico.

### 4. Análisis Estadístico

La determinación de actividad inhibitoria de tirosinasa y ureasa se llevó a cabo por métodos cualitativos y cuantitativos. La actividad antioxidante se determinó por método cuantitativo únicamente.

#### a. Cualitativos

En esta metodología se realizó prueba de hipótesis binomial, en donde se obtuvieron resultados de actividad inhibitoria positiva o negativa, se realizaron un total de cinco réplicas de cada extracto para obtener un nivel alfa igual a 0.05 ( $\alpha=0.05$ ).

Se planteó una hipótesis nula en donde un valor de  $p=0.5$  representara actividad negativa y una hipótesis alterna en donde un valor  $p \neq 0.5$  representara actividad positiva. Para rechazar la hipótesis nula, se requirió que el resultado de las cinco réplicas de cada extracto sea positivo.

#### b. Cuantitativos

Para la determinación de la actividad inhibitoria de tirosinasa y ureasa, el resultado se obtuvo a partir de las curvas estándar de cada actividad en  $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Se realizaron cinco diluciones de cada extracto, 1:30, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400. Con las diluciones de cada

extracto se realizó un mínimo de cinco replicas, se tomó la concentración que inhibió más del 50%, se realizó un promedio del resultado obtenido y se calculó la desviación estándar. Para la determinación de actividad antioxidante se realizaron cinco réplicas por extracto obtenido de cada especie (diez extractos diclorometánicos y diez metanólicos) así como del estándar, en este caso ácido ascórbico, se calculó la ecuación de la recta y se evaluó estadísticamente con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ). Todas las mediciones se representaron en diagramas de dispersión para determinar gráficamente la tendencia de los datos. Se obtuvo un comportamiento lineal con el que se realizó un análisis de regresión lineal (simple). Para cada extracto, se calculó el valor de Concentración Inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) con un intervalo de confianza del 95%.

## VIII. RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó la actividad antitirosinasa, antiureasa y antioxidante en extractos diclorometánicos y metanólicos de diez especies de plantas del género *Piper*, nativas del continente americano.

### A. Colecta y obtención de extractos metanólicos y diclorometanólicos de diez especies de plantas del género *Piper*

Se realizó la colecta del material vegetal en su área de crecimiento silvestre en La Ecoparcela El Kakawatal (Samayac, Suchitepéquez), durante el periodo de marzo 2010 a abril 2012. Las especies incluidas se listan en el Cuadro 1, con el nombre científico, parte de la planta utilizada, lugar de procedencia y coordenadas geográficas del lugar; también se incluyen los porcentajes de rendimiento obtenidos en la preparación de extractos diclorometánicos y metanólicos de cada especie.

Únicamente se realizaron extractos de cinco plantas, *Piper hispidum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron*, *P. retalhuleuense* y *P. variabile*, el resto de extractos utilizados, *Piper amalago*, *P. auritum*, *P. psilorhachis*, *P. sempervirens* y *P. umbellatum* fueron obtenidos de un proyecto previo en el cual se utilizó la misma metodología y habían sido almacenados a 4°C.

**Cuadro 1.** Colecta y obtención de extractos.

Especie <i>Piper</i>	Parte utilizada	Procedencia	Coordenadas geográficas	Numero de Herbario CFEH	Rendimiento (%)	
					Metanol	Diclorometano
<i>P. amalago</i> L	Hoja	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14°20'10.9"N 091°30'37.1"O	1073	7.96	3.52
<i>P. auritum</i> HBK	Hoja	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14°33'04.6"N 091°27'56.8"O	1072	6.26	7.54
<i>P. hispidum</i> Swartz	Hoja	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14°33'06.4"N 091°27'57.6"O	1071	9.18	7.98
<i>P. Jacquemontianum</i> Kunth	Hoja	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14°33'06.3"N 091°27'57.9"O	1069	7.37	8.63
<i>P. oradendron</i> Trelease & Standley	Hoja	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14°33'05.8"N 091°27'59.6"O	1075	8.41	7.34
<i>P. psilorhachis</i> C. DC	Hoja	Aldea Pozo Seco, Chisec, Alta Verapaz	15°54'50.1"N 090°31'19.5"O	1143	10.71	5.42
<i>P. retalhuleunse</i> Trelease & Standley	Hoja	Parcelamiento Monterrey, Santo Domingo, Such.	14°20'10.9"N 091°30'37.1"O	1053	6.97	7.25
<i>P. sempervirens</i> Lundell	Hoja	Aldea Pozo Seco, Chisec, Alta Verapaz	15°54'55.4"N 090°31'14.6"O	1113	11.49	6.33
<i>P. umbellatum</i> L.	Hoja	Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez	14°33'06.9"N 091°28'00.5"O	1070	8.89	7.43
<i>P. variable</i> C. DC. ex Donn. Smith	Hoja	Aldea Pozo Seco, Chisec, Alta Verapaz	15°54'49.8"N 090°31'18.2"O	1140	15.53	3.29

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT y Departamento de Citohistología.



## **B. Validación de métodos**

Para trabajar los veinte extractos, en primer lugar se validaron las pruebas correspondientes, de la manera que se describe a continuación, tanto para los métodos cualitativos como cuantitativos.

### **1. Método cualitativo**

Para la técnica de TLC para la inhibición de tirosinasa se utilizó como estándar ácido kójico, se realizó una carga de 5  $\mu\text{L}$  del control y dos cargas de 5  $\mu\text{L}$  de los extractos diclorometánicos (acetona únicamente) y metanólicos (dilución 1:20 de DMSO:Acetona) obteniendo una concentración de 20 mg/mL, realizando el proceso por triplicado en placas de sílica gel, obteniendo resultados similares en cada una de estas.

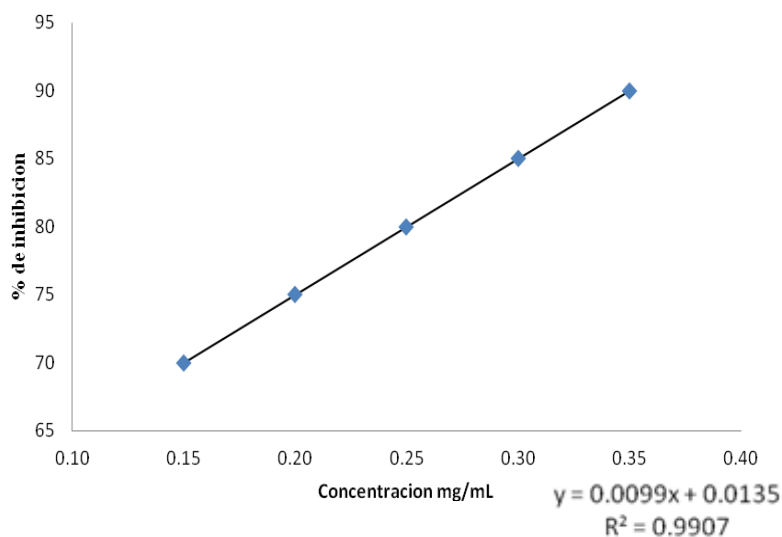
Para la técnica de TLC para la inhibición de ureasa se utilizó como estándar omeprazol, se realizó una carga de 5  $\mu\text{L}$  del control y dos cargas de 5  $\mu\text{L}$  de los extractos diclorometánicos (metanol únicamente) y metanólicos (dilución 1:20 de DMSO:metanol) obteniendo una concentración de 20 mg/mL, realizando el proceso por triplicado en placas de sílica gel, obteniendo resultados similares en cada una de estas.

### **2. Método cuantitativo**

#### **a. Macrométrico**

En la técnica de reducción de hierro el primer paso fue realizar la curva del ácido ascórbico hasta obtener un  $r^2 = 0.9907$  para posteriormente obtener los microequivalentes presentes en la plantas. Cada prueba fue realizada por quintuplicado, cumpliendo con lo requerido para un análisis estadístico confiable. Cada corrida fue validada verificando que las absorbancias obtenidas en el estándar daban como resultado un valor cercano a la concentración conocida.

## Poder Reductor de Hierro

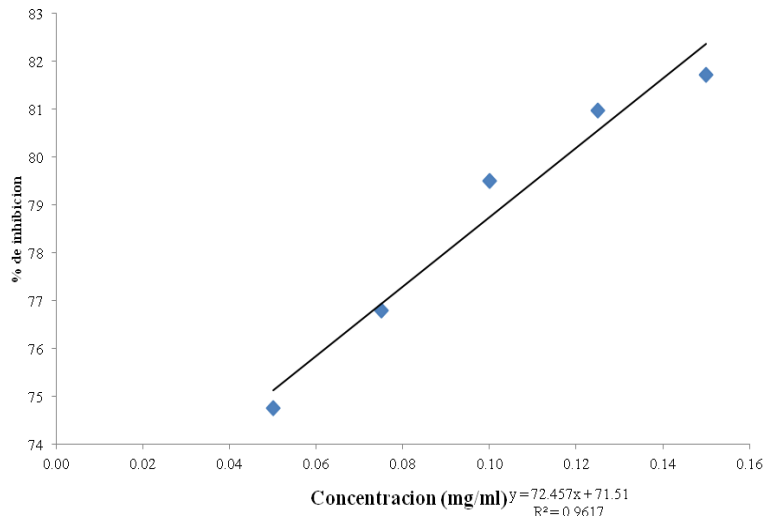


**Gráfica 1.** Porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos con el método macrométrico de Reducción de Hierro.

b. Micrométrico

Para el porcentaje de inhibición de la actividad tirosinasa se realizó una serie de diferentes concentraciones del control, ácido kójico: 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$ , se realizó por quintuplicado cada prueba en tres diferentes corridas, se realizó una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta, hasta obtener un valor de  $r^2$  entre 0.95 a 0.99. Se realizaron promedio de los datos obtenidos de cada concentración, se registraron los resultados de la curva, a partir de esto se calculó el porcentaje de inhibición de la absorbancia y de mediante la curva, la concentración.

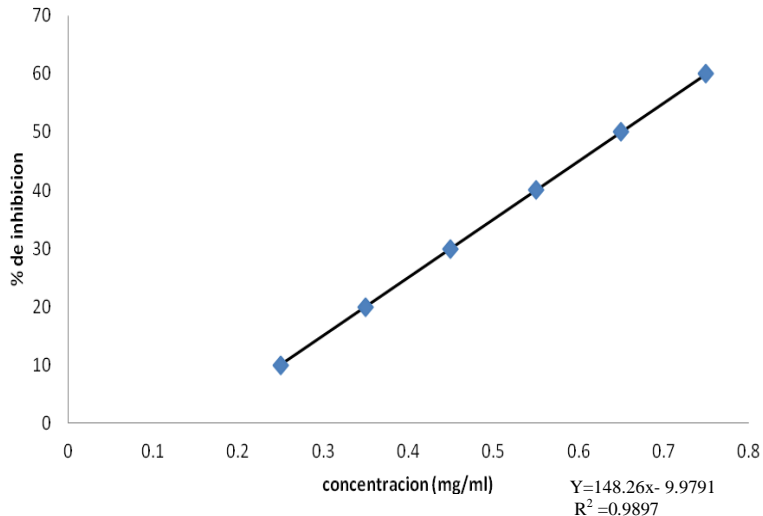
## Actividad Antitirosinasa



**Gráfica 2.** Porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos con el método micrométrico del estándar de tirosinasa.

Para el porcentaje de inhibición de la actividad de ureasa se realizó una serie de diferentes concentraciones de los controles, ácido fólico y omeprazol de la siguiente forma: 25, 50, 75, 100 y 125  $\mu\text{g}$ , los cuales se realizó por quintuplicado en tres diferentes corridas, se realizó una regresión lineal para determinar la ecuación de la recta, hasta dar un valor de  $r^2$  entre 0.95 a 0.99, se realizaron promedio de los datos, se registraron los resultados de la curva y se calculó el porcentaje de inhibición de la absorbancia y mediante la curva, se calculó la concentración.

## Actividad Antiureasa



**Gráfica 3.** Porcentaje de inhibición de los resultados obtenidos con el método micrométrico del estándar de ureasa.

### C. Determinación de la inhibición de tirosinasa en especies del género *Piper*

A cada extracto de las especies estudiadas se le realizó un análisis de actividad inhibitoria de la tirosinasa utilizando la técnica de TLC, empleando L-tirosinasa como revelador y el método microcolorimétrico para la cuantificación de la inhibición, esto mediante la disminución de las absorbancias. Los resultados son los siguientes.

#### 1. Cromatografía en capa fina (TLC)

En el Cuadro 2 se observan que los resultados obtenidos fueron positivos en todos los extractos diclorometánicos y metanólicos. El extracto diclorometánico de *P. retalhuleuense* y los extractos metanólicos de *P. psilorhachis* y *P. variable* mostraron dos bandas de inhibición.

**Cuadro 2.** Inhibición de la tirosinasa en extractos de *Piper* por TLC

Clave	Especie	Disolvente	Rf1	Rf2	Resultado
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	1.3	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.1	-	+
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	1.3	-	+
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.7	-	++
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	1.3	-	+
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.6	-	+
4	<i>P. Jacquemontianum</i>	MetOH	1.4	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.1	-	+
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	1.9	-	+
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.6	-	+
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	1.0	1.7	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.6	-	++
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	1.4	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.3	2.9	++
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	2.0	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.4	4	++
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	1.3	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5.0	-	++
10	<i>P. variable</i>	MetOH	0.9	1.7	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	6.1	-	++
A	Ácido kójico	Estándares	5.2	-	+++

(+): Leve inhibición; (++) : Moderada inhibición; (+++) : Fuerte inhibición p = 0.032 (Prueba binomial) n =5 réplicas.

Rf1: Relación de frente del primer compuesto; Rf2: Relación de frente del segundo compuesto

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

## 2. Cuantificación microcolorimétrico de la actividad inhibitoria de tirosinasa

En el Cuadro 3 se observa los extractos que presentaron actividad inhibitoria de tirosinasa. En los resultados se muestra la concentración de inhibición al 50% (CI<sub>50</sub>) con el intervalo de confianza al 95%, así como el estándar de referencia y se reporta la capacidad inhibitoria equivalente al ácido kójico de cada extracto.

Los extractos con mejor actividad utilizando esta metodología fueron *P. variable*, *P. umbellatum*, y *P. psilorhachis*, mientras el que presento la menor actividad fue el

extracto de *P. hispidum* Además puede observarse que el extracto que presentó la mejor inhibición en ambos solventes fue *P. variable* presentando  $CI_{50}$ , (2.0  $\mu\text{g/mL}$  y 2.1  $\mu\text{g/mL}$ ) similares.

**Cuadro 3.** Actividad inhibitoria de tirosinasa determinada por metodología micrométrica

No.	Especie	Disolvente	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	Intervalo de confianza al 95%	$\mu\text{g EAK/mg}$
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	10.4 $\pm$ 0.8	9.6- 11.2	7.96 $\pm$ 0.3
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	34.8 $\pm$ 1.6	33.2-36.8	20.1 $\pm$ 0.9
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	42.8 $\pm$ 3.2	39.6-46.0	37.5 $\pm$ 0.5
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	15.0 $\pm$ 0.8	14.2-15.8	58.4 $\pm$ 1.2
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	45.2 $\pm$ 2.8	42.4-48.0	62.3 $\pm$ 2.1
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	46.8 $\pm$ 1.7	45.1-48.5	74.5 $\pm$ 0.4
4	<i>P. jacquemontianum</i>	MetOH	6.8 $\pm$ 0.3	6.5-7.1	16.0 $\pm$ 0.7
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	28.5 $\pm$ 0.8	27.7-29.3	65.8 $\pm$ 1.3
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	30.8 $\pm$ 1.2	29.6-32.0	36.4 $\pm$ 0.2
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	38.7 $\pm$ 1.9	36.8-40.6	71.1 $\pm$ 2.6
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	6.5 $\pm$ 0.3	6.2-6.8	15.9 $\pm$ 0.9
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	19.8 $\pm$ 0.8	19.0-20.6	64.5 $\pm$ 3.1
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	12.5 $\pm$ 0.4	12.1-12.9	38.5 $\pm$ 2.1
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7.6 $\pm$ 0.5	7.1-8.1	44.2 $\pm$ 1.4
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	19.0 $\pm$ 0.7	18.3-19.7	36.5 $\pm$ 1.2
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	7.9 $\pm$ 0.3	7.6-8.2	48.9 $\pm$ 2.4
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	6.6 $\pm$ 0.2	6.4-6.8	31.3 $\pm$ 1.3
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.9 $\pm$ 0.2	4.7-5.1	20.0 $\pm$ 0.8
10	<i>P. variable</i>	MetOH	2.1 $\pm$ 0.1	2.0-2.2	5.4 $\pm$ 0.2
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.0 $\pm$ 0.1	1.9-2.1	4.4 $\pm$ 0.2
A	Ácido kójico	Estándar	1.2 $\pm$ 0.07	1.1 -1.3	NA

EAK: Equivalentes de ácido kójico por mg de extracto

NA: No aplica

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología

#### D. Determinación de la inhibición de ureasa en especies del género *Piper*

Se realizó la evaluación a partir de la técnica de rojo de fenol en placas de silica gel, los resultados son los siguientes.

##### 1. Cromatografía en capa fina

En el Cuadro 4 se presenta la actividad inhibitoria de la ureasa, los resultados obtenidos fueron positivos en todos los extractos diclorometánicos y metanólicos. El extracto metanólico de *P. psilorhachis* mostro dos bandas de inhibicion.

**Cuadro 4.** Inhibición de la ureasa en extractos de *Piper* por TLC

No.	Especie	Disolvente	Rf1	Rf2	Resultado
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	4.0	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.1	-	++
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	3.0	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.4	-	++
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	1.7	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.4	-	++
4	<i>P. Jacquemontianum</i>	MetOH	2.6	-	+
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.0	-	++
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	1.3	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.6	-	++
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	5.3	5.8	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.8	-	++
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	3.4	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.4	-	++
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	2.5	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.6	-	++
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	3.2	-	++
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.9	-	++
10	<i>P. variable</i>	MetOH	4.3	-	+
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.8	-	+
A	Omeprazol	Estándar	5.0	-	+++

(+): Leve inhibición; (++) Moderada inhibición; (+++) Fuerte inhibición p = 0.032 (Prueba binomial) n =5 réplicas. Revelador rojo de fenol.

Rf1: Relación de frente del primer compuesto; Rf2: Relación de frente del segundo compuesto

Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

## 2. Cuantificación microcolorimétrica de la actividad inhibitoria de ureasa

En el Cuadro 5 se observan los extractos que presentaron actividad inhibitoria de ureasa, así como el estándar de referencia y se reporta la capacidad inhibitoria equivalente al omeprazol de cada extracto. Los extractos con mejor actividad utilizando esta metodología fueron *P. psilorhachis*, *P. umbellatum* y *P. retalhuelenses* mientras el que presento la menor actividad fue el extracto de *P. variable*.

**Cuadro 5.** Actividad inhibitoria de ureasa determinada por metodología micrométrica con rojo de fenol.

No.	Especie	Disolvente	CI <sub>50</sub> µg/mL	Intervalos de confianza al 95%	µg EO/mg
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	22.3 ± 1.5	20.8 – 23.8	19.1 ± 0.5
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	18.2 ± 1.0	17.2 – 19.2	16.5 ± 0.5
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	30.3 ± 1.3	29.0 – 31.6	25.6 ± 1.2
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	12.2 ± 0.9	11.3 – 13.1	13.7 ± 0.8
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	17.9 ± 1.1	16.8 – 19.0	18.1 ± 1.0
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	29.4 ± 1.5	27.9 – 30.9	23.0 ± 1.6
4	<i>P. jacquemontianum</i>	MetOH	15.7 ± 1.0	14.7 – 16.7	18.6 ± 0.4
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	26.3 ± 1.8	24.5 – 28.1	24.7 ± 0.8
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	31.6 ± 1.2	30.8 – 32.8	22.1 ± 0.7
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	27.5 ± 1.0	26.5 – 28.5	30.8 ± 1.6
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	1.9 ± 0.08	1.8 – 2.0	3.5 ± 1.1
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.1 ± 0.09	2.0 – 2.2	3.6 ± 0.9
7	<i>P. retalhuelenses</i>	MetOH	4.1 ± 0.07	4.0 – 4.2	4.6 ± 1.3
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.8 ± 0.06	4.7 – 4.9	5.5 ± 0.8
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	13.7 ± 0.9	12.8 – 14.6	12.2 ± 0.6
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	12.9 ± 0.9	12.0 – 13.8	11.3 ± 1.1
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	2.5 ± 0.06	2.4 – 2.6	3.9 ± 0.9
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5.6 ± 0.09	5.5 – 5.7	4.6 ± 0.8
10	<i>P. variable</i>	MetOH	34.8 ± 1.3	33.5 – 36.1	45.5 ± 1.2
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	32.3 ± 1.7	30.6 – 34.0	53.3 ± 0.9
A	Omeprazol	Estándar	1.4 ± 0.05	1.3 – 1.5	NA

EO: Equivalentes de omeprazol por mg de extracto

NA: No aplica

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología



## E. Determinación de la actividad antioxidante por FRAP

En el Cuadro 6 se observa, que los mejores resultados los presentan los extractos metanólicos de *P. psilorachis* y *P. variable*.

La menor actividad en general la presentaron los extractos metanólicos de *P. umbellatum* y *P. oradendron*.

**Cuadro 6.** Actividad antioxidante determinada macrométricamente por FRAP

No.	Especie	Disolvente	CI <sub>50</sub> µg/mL	Intervalos de confianza al 95%	µg EAS/mg
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	14.9 ± 0.9	14.0 – 15.8	69.32 ± 0.41
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	23.8 ± 1.7	22.1 – 25.5	44.45 ± 0.63
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	11.2 ± 0.9	10.3 – 12.1	34.96 ± 0.25
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	13.3 ± 1.0	12.3 – 14.3	30.07 ± 0.90
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	22.6 ± 1.6	21.0 – 24.2	35.89 ± 0.18
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	24.1 ± 1.5	22.6 – 25.6	33.12 ± 0.28
4	<i>P. jacquemontianum</i>	MetOH	25.8 ± 1.8	24.0 – 27.6	52.39 ± 0.68
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	14.6 ± 1.0	13.6 – 15.6	51.71 ± 0.91
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	35.3 ± 2.4	32.9 – 37.7	74.97 ± 0.52
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	22.6 ± 1.9	20.7 – 24.9	38.74 ± 0.97
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	2.1 ± 0.06	2.0 – 2.2	21.76 ± 0.74
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.0 ± 0.2	3.8 – 4.2	22.80 ± 0.49
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	8.2 ± 0.4	7.8 – 8.6	29.87 ± 0.26
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	14.7 ± 0.9	13.8 – 15.6	34.14 ± 0.27
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	6.4 ± 0.2	6.2 – 6.6	50.65 ± 0.62
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	14.6 ± 0.8	13.8 – 15.4	39.22 ± 0.91
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	26.4 ± 1.6	24.8 – 28.0	86.91 ± 0.46
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	19.9 ± 1.2	18.7 – 21.1	67.06 ± 0.26
10	<i>P. variable</i>	MetOH	2.6 ± 0.09	2.5 – 2.7	25.56 ± 1.26
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4.8 ± 0.1	4.7 – 4.9	30.28 ± 0.41
<b>Ácido ascórbico</b>	Estándar	-	1.6 ± 0.09	1.5 – 1.7	NA

EAS: Actividad antioxidante equivalente a ácido ascórbico MetOH: Metanol; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Diclorometano  
Fuente: Datos experimentales obtenidos en LIPRONAT

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

*Piper* es un género que pertenece a la familia *Piperaceae*, que como angiospermas basales se encuentran sobre la superficie terrestre desde hace varios millones de años. Las especies pertenecientes a la familia *Piperaceae* frecuentemente son arbustos aromáticos, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Los dos géneros más grandes son *Piper* y *Peperomia*, conteniendo cada uno alrededor de 1.000 especies (Standley & Williams, 1976). Esta investigación se centró en estudiar diez especies del género *Piper*.

Las plantas del género *Piper* son conocidas como cordoncillo y se les atribuye propiedad analgésica, antirreumática, diurética, estimulante, digestiva, antiulcerosa, antihelmíntica y bactericida, son ampliamente utilizadas para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales y como antimicrobiano (Gómez, 2008). Por esta amplia diversidad de usos fueron seleccionadas para este estudio en el cual se evaluó la actividad antitirosinasa, antiureasa y antioxidante de especies nativas, además por poseer una amplia complejidad química y biológica.

Para analizar la actividad mencionada se procedió a coleccionar el material vegetal, de las especies de interés (Fotografía 1). En el Cuadro 1 se observa la información general de las diez especies utilizadas en esta investigación, la procedencia del material vegetal, la cual fue recolectada en diferentes partes del territorio nacional, siete en Suchitepequez y tres en Alta Verapaz. Los extractos que se obtuvieron de cada especie fueron apolares (extractos con diclorometano) y polares (extractos con metanol), para analizar un total de 20 extractos.

Los porcentajes de rendimiento obtenidos fueron mejores en los extractos metanólicos que en los diclorometánicos con excepción de *P. auritum*, *P.*

*jacquemontianum* y *P. retalhuleuense*, el mejor rendimiento de los extractos metanólicos se obtuvo con *P. variabile* (15.53%), seguido de *P. sempervirens* (11.49%) y *P. psilorhachis* (10.71%); de los extractos diclorometánicos el mejor rendimiento se obtuvo de *P. jacquemontianum* (8.63%). Según Cáceres y colaboradores en el 2009 en el proyecto FODECYT 17-2009, estudiaron once especies de este género, incluidas ocho de esta investigación, en donde se obtuvo que el extracto diclorometánico que presentó mayor porcentaje de rendimiento fue *P. jacquemontianum*, mientras que de los extractos metanólicos el mejor rendimiento se obtuvo de *P. variabile* y *P. retalhuleunse*. Otro estudio previo llevado a cabo en la Universidad San Carlos de Guatemala se estudiaron las especies *P. umbellatum*, *P. oradendron*, y *P. jacquemontianum*, se obtuvieron porcentajes de rendimiento en metanol y diclometano para cada una de 7% y 9.18%, 4.94 y 6.02 y 8.13 y 11.01%, con lo que se evidencia que en ambos estudios se obtuvieron porcentajes de rendimiento similares a los obtenidos en la presente investigación y además que el extracto diclometánico de *P. jacquemontianum* es de las especies de las cuales se obtuvo mayor rendimiento en las tres investigaciones (Gómez, 2008).

La variación en los porcentajes de rendimiento se ven afectados por factores como el proceso de extracción, la naturaleza de los metabolitos (polar o apolar), el disolvente utilizado, la época del año en que se colecta y el lugar de procedencia (Gómez, 2008).

Antes de comenzar con el análisis de los extractos en estudio, fue necesario validar por medio de curvas dosis-efecto los estándares para cada una de las metodologías anteriormente descritas por terceros y adaptándolas a las condiciones del laboratorio, esto con el fin de que cada uno de los métodos demuestre científicamente que una metodología tiene las características de desempeño adecuadas para cumplir con dar resultados tanto confiables como reproducibles.

Para evaluar cada una de las actividades, se utilizaron estándares cuya alta actividad ha sido comprobada anteriormente, para la determinación de la actividad antitirosinasa, se utilizó como estándar el ácido kójico que actúa inhibiendo la acción de la tirosinasa en el proceso de producción de melanina (Momtaz et al., 2008).

Para evaluar la inhibición de la actividad antiureasa, se utilizó como estándar el omeprazol, que es un fármaco antiulceroso utilizado en úlceras asociadas a *Helicobacter pylori* ya que realiza una inhibición competitiva por el sitio activo de la enzima (Krajewska & Brindell, 2011).

Para la actividad antioxidante se utilizó el ácido ascórbico también conocido como vitamina C, que es un potente antioxidante, que protege contra los radicales libres (Cui, Luo, Xu & Ven, 2004).

Con las respectivas validaciones se determinaron las fuentes de variabilidad y los errores sistemáticos, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de las muestras reales. Además el uso de los estándares corridos permitió corregir los actos y condiciones que afectaban la validación de los resultados, así como la confiabilidad de los analitos, asegurando así datos óptimos.

Esta investigación ha permitido conocer actividades enzimáticas y antioxidantes de extractos diclorometánicos y metanólicos de manera que se establecieron diferentes metodologías para evaluar las diferentes actividades y conocer la potencial aplicación en medicina, cosmetología y conservación de alimento.

Se llevo a cabo la determinación de la actividad antitirosinasa, según estudios realizados por Kim y colaboradores en el 2002, la tirosinasa es la enzima limitante de la velocidad de la biosíntesis de pigmentos de melanina responsables de la coloración del

pelo, piel y ojos. Los inhibidores de la tirosinasa se han utilizado en productos cosméticos que se promueven para aclarar la piel (Hiari, Joray, Ruiz, Palacios & Carpinella, 2010).

Los tratamientos tópicos estándar para los trastornos de hiperpigmentación incluyen inhibidores de la tirosinasa, pero la mayoría de ellos no reúnen todos los requisitos de eficacia clínica, o se observan efectos adversos (Casañola et al., 2007). Por lo tanto, la atención se ha prestado a agentes alternativos como sustancias derivadas de plantas, que han demostrado ser seguros y eficaces como complemento para el tratamiento de algunos trastornos en los seres humanos (Cai, et al., 2012).

Es por esto que el presente estudio investiga nuevos inhibidores de la tirosinasa a partir de fuentes naturales como plantas que ayudarían a reducir al mínimo la toxicidad y efectos secundarios de los fármacos actualmente utilizados en el cuidado de la salud y la medicina para el tratamiento de trastornos de la piel.

En este estudio se demostró que ciertas especies del género *Piper*, presentan actividad inhibitoria de la tirosinasa. Se determinó la presencia de la actividad antitirosinasa en extractos orgánicos de especies del género *Piper*, el método cualitativo de TLC se realizó revelando actividad positiva debido a un efecto quelante, ya que el sitio activo de las especies separa el ion metálico de la enzima ( $\text{Cu}^{+}$ ), del sistema formando un complejo y haciendo que el ion metálico no pueda participar o catalizar la reacción sustrato-enzima, mostrándose así las zonas claras de inhibición de tirosinasa en todos los extractos diclorometánicos evaluados como se observa en el Cuadro 2 (Fotografía 5 y 6). Algunos de los diez extractos analizados presentaron dos bandas de inhibición en el segundo extracto (metanólico), esto como consecuencia que los extractos metanólicos contienen las moléculas que poseen la actividad antitirosinasa que fue extraída por este disolvente principalmente por su alta polaridad. El diclorometano por ser de baja polaridad fue capaz

de extraer mayoritariamente las grasas contenidas debido a su carácter hidrófobico, lo cual contribuye a eliminar los falsos positivos (Chiari et al., 2010).

En el Cuadro 3 se presentan los resultados expresados en la  $CI_{50}$  de los extractos, determinándose que la mejor actividad inhibitoria de la tirosinasa la presentó el extracto diclorometánico ( $CI_{50}$  2.0  $\mu\text{g/mL}$ ) y metanólico ( $CI_{50}$  de 2.1) de *P. variabile*, ya que inhibió el 50% de la tirosinasa con la menor cantidad de extracto según la interpretación de Momtaz y colaboradores en el 2008.

El extracto que presentó la segunda mejor actividad fue el extracto diclorometánico de *P. umbellatum* ( $CI_{50}$  4.9  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido de el extracto metanólico de *P. psilorachis* ( $CI_{50}$  6.5  $\mu\text{g/ml}$ ), mientras que, el que presentó la menor actividad fue el extracto diclorometánico de *P. hispidum* ( $CI_{50}$  46.8  $\mu\text{g/mL}$ ). Al comparar los resultados de los extractos con el estándar de referencia se puede observar que el estándar presenta una actividad inhibitoria de tirosinasa superior a los extractos analizados, la especie que más se acerca al  $CI_{50}$  de los estándares es el extracto diclorometánolico de *P. variabile*, por lo que la identificación de los compuestos químicos en esta especie, capaces de modular el metabolismo de la pigmentación es de gran interés, cabe mencionar que podría deberse a un falso positivo de inhibición enzimática por la interferencia de las grasas por ser este un disolvente apolar, pero esto habrá que confirmarlo (Curto et al., 1999).

En el Cuadro 3 se presenta que el extracto que demostró la menor cantidad de equivalentes fue *P. variabile*, en el extracto diclorometánico ( $4.4 \pm 0.2$   $\mu\text{gEAK/mg}$ ) y metanólico ( $5.4 \pm 0.2$   $\mu\text{gEAK/mg}$ ), seguido de los extractos metanólicos de *P. amalago* ( $7.9 \pm 0.3$   $\mu\text{g EAK/mg}$ ), extracto diclorometánico de *P. psilorhachis* ( $15.9 \pm 0.3$   $\mu\text{g EAK/mg}$ ) y por último el extracto metanólico de *P. Jacquemontianum* ( $16.0 \pm 0.3$   $\mu\text{g EAK/mg}$ ). La especie que reportó mayor cantidad de EAK fue el extracto diclorometánico

de *P. hispidum* ( $71.1 \pm 0.3 \mu\text{gEAK/mg}$ ) y *P. sempervirens* ( $66.9 \pm 5.4 \mu\text{gEAK/mg}$ ) por lo que se esperaría una menor actividad inhibidora de la tirosinasa, ya que entre menor sea el valor de  $\mu\text{g EAK/mg}$  de extracto mayor inhibición se esperaría (Lin et al., 2007).

Al revisar la literatura no se encontró ninguna información disponible de estudios previos en donde se investigue la actividad antitirosinasa en las especies de *Piper* incluidas en este estudio, únicamente de *Piper auritum* debido a que es nativa de Mesoamerica y se reportan más investigaciones de actividades en esta. En nuestro estudio se encontró un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $42.8 \mu\text{g/mL}$  en el extracto metanólico y  $15.0 \mu\text{g/mL}$  en el diclorometánico mientras que el estudio realizado por Lin y colaboradores (2007) se reportó que *P. auritum* presenta actividad antitirosinasa en el extracto acuoso con un  $\text{CI}_{50}$  de  $5.6 \mu\text{g/mL}$ , la diferencia de resultados podría deberse a que no se realizó una extracción con disolventes y las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo.

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos tópicos estándar para los trastornos de hiperpigmentación que se utilizan en medicina, la mayoría de ellos no reúnen todos los requisitos de eficacia clínica, o se observan efectos adversos, por lo que es necesario realizar más estudios que den una prueba clara de su poder despigmentante y eficacia clínica, así como estudios químicos y toxicológicos a las plantas que inhibieron un mayor del 50% para poder utilizarlos en beneficio el ser humano (Casañola et al., 2007).

Se determinó la actividad antiureasa en las especies del género *Piper* seleccionadas, la ureasa es una enzima que se encuentra distribuida en algas, bacterias, hongos y plantas, esta cataliza la hidrólisis de la urea para la producción de amoníaco, que cambia el pH del sitio en donde actúa; en el sistema gastrointestinal se ha relacionado con el desarrollo de úlceras gástricas. (Paulo, Oleastro, Gallardo, Antonio & Domínguez, 2011).

El estudio de compuestos activos en plantas se ha incrementado, para la obtención de medicamentos que inhiban enzimas de manera específica, algunos de los estudios han evaluado la actividad inhibitoria de ureasa, primero se dio como búsqueda de moléculas y luego en plantas evaluando la presencia de algunos de estos compuestos (Amtul et al., 2002).

Como se muestra en el Cuadro 5, el estándar utilizado (omeprazol) mostró un valor de  $CI_{50}$  de 1.4  $\mu\text{g/ml}$  comprobando con esto su alta eficacia. Según la literatura la inhibición de la enzima ureasa se da por diferentes compuestos principalmente por alcaloides, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiacos, taninos, glucósidos cianogenéticos y flavonoides, algunos de estos compuestos podrían ser parte de los metabolitos secundarios de las plantas utilizadas en este estudio.

La primera prueba realizada fue la cromatografía de capa fina, como se muestra en el Cuadro 4 todos los extractos presentaron bandas de inhibición, lo que indica que dentro del extracto se encuentra algún tipo de molécula capaz de unirse a la enzima y evitar la hidrólisis de la urea. Estos resultados son tanto positivos para los extractos diclorometánicos como los metanólicos. *P. psilorachis*, demostró que posee dos tipos de compuestos activos ya que presentó dos bandas de inhibición con  $R_f$  similares, a los presentados por las otras plantas con resultados positivos. Se puede indicar por estos resultados que se trata de dos familias de compuestos, que actuaron como inhibidores pues los  $R_f$  presentan valores similares (5.3 y 5.8) aunque no se trata necesariamente de un imidazol, ya que los  $R_f$  del compuesto control son diferentes (5.0) (Adeniyi & Anyiam., 2004).

En el Cuadro 5 se presentan los resultados expresados en la  $CI_{50}$  de los extractos, determinándose que la mejor actividad inhibitoria de la ureasa la presentaron los extractos



diclorometánicos y metanólicos de *P. psilorachis* (CI<sub>50</sub> 1.9 µg/mL y 2.1 µg/mL respectivamente) seguido del extracto metanólico *P. umbellatum* (CI<sub>50</sub> 2.5 µg/mL) luego el extracto metanólico de *P. retalhuelense* (CI<sub>50</sub> de 4.1 µg/mL) ya que inhibieron el 50% de la ureasa con la menor cantidad de extracto.

Al comparar los resultados de los extractos con el estándar de referencia se puede observar que el estándar presenta una actividad inhibitoria de ureasa superior a los extractos analizados, la especie que más se acerca al CI<sub>50</sub> de los estándares es el extracto metanólico de *P. psilorachis*, por lo que la identificación de los compuestos químicos en esta especie, es de gran interés.

En el Cuadro 5 se presenta que el extracto que demostró la menor cantidad de equivalentes fue *P. psilorachis* en el extracto diclorometánico ( $3.5 \pm 1.1$  µgEAK/mg), seguido de los extractos metanólicos de *P. umbellatum* ( $3.9 \pm 0.9$  µg EAK/mg). Las especies que reportaron mayor cantidad de EAK fueron los extractos metanólicos de *P. variable* ( $53.3 \pm 0.9$  µg EAK/mg) y *P. oradendron* ( $30.8 \pm 0.9$  µg EAK/mg) por lo que se esperaría una menor actividad inhibidora de la ureasa, ya que entre menor sea el valor de µg EAK/mg de extracto mayor inhibición se esperaría (Lin et al., 2007).

Al realizar la revisión bibliográfica no se encontró información disponible de estudios previos en donde se investigue la actividad antiureasa en las especies de *Piper* incluidas en este estudio, ya que son especies nativas del Continente americano y se esperaría que en Sudamerica se encuentren datos, sin embargo se encontraron estudios, donde se demuestra la actividad de especies del género *Piper* contra la enzima ureasa pero no de las diez especies incluidas en este estudio.

Según Halliwell (2011), una sustancia antioxidante es aquella molécula que tiene como objetivo principal proteger un tejido biológico contra el daño oxidativo. Un radical

libre una molécula inestable que contiene uno o más electrones no apareados, es decir, que posee un electrón impar en órbita, y tiende a buscar moléculas estables para formar combinaciones con ellas y saturar sus electrones. A este proceso se le conoce como oxidación (Halliwell & Grootveld, 1987).

Para conocer la actividad antioxidante del extracto se midió el poder reductor de hierro, en LIPRONAT, monitoreando la formación de un complejo coloreado, comparados con el estándar ácido ascórbico. El poder reductor es indicativo de su capacidad antioxidante. Se obtuvo la concentración que cada extracto presentaba comparándolo con los  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico utilizados. Una sustancia posee mayor actividad antioxidante cuando requiere menor cantidad de microgramos para reducir el hierro.

Al correlacionar la actividad antioxidante como una función de la naturaleza del disolvente extractor, se observaron diferencias significativas entre los extractos.

Se sabe que el metanol es el mejor disolvente extractor de los compuestos activos de las especies, esto se debe a que este logra extraer los compuestos fenólicos debido a la alta polaridad que posee, como se observa en el Cuadro 6 (Martinez & Crespi, 1997).

La mayor actividad con poder reductor de hierro se encuentra en los extractos metanólicos, de *P. psilorachis* con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $2.1 \mu\text{g/mL}$  y *P. variable* con un valor de  $2.6 \mu\text{g/mL}$ . Cáceres y colaboradores (2009) en el Proyecto FODECYT 17-2009 evaluaron la actividad antioxidante por las técnicas de DPPH y ABTS, al comparar los resultados de las tres metodologías se encontró que los extractos metanólicos de las hojas de *P. psilorhachis* y *P. variable* dieron la mayor actividad por los tres métodos evidenciando con esto que nuestros resultados correlacionan con los hallazgos.

La actividad antioxidante de algunos extractos polares es debida, al menos en parte, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por

donación de protones (capacidad secuestrante de radicales libre), o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones) (Martinez & Crespi, 1997).

Las plantas con menores concentraciones, según esta metodología, fueron *P. oradendron* (CI<sub>50</sub> 35.3 µg/mL) y *P. umbellatum* (CI<sub>50</sub> 26.4 µg/mL), como puede observarse en el Cuadro 6, los extractos con ambos disolventes presentan baja capacidad de reducir el hierro, por lo que no se consideran de importancia significativa, sin embargo sería de importancia su estudio en otro tipo de disolventes. Estos resultados correlacionan con los obtenidos en el proyecto anteriormente mencionado.

Al momento de realizar el análisis estadístico, se observa que ninguno de los intervalos de confianza de los extractos analizados se encuentran entre el rango obtenido para el estándar en cada una de las metodologías estudiadas, por lo que se concluye que a pesar que algunas especies presentan actividad, ninguna presenta una actividad tan eficaz como los estándar.

Con los resultados obtenidos en cada actividad se realizó pruebas de hipótesis binomial, en los extractos que presentan actividad, se obtuvo un valor de  $p \leq 0.5$ , siendo estos estadísticamente significativos.

Con estos hallazgos se evidencia el potencial del genero *Piper* para ser utilizado como potentes agentes protectores de la piel para tratar úlceras, así como también componentes antioxidantes naturales para reducir el daño oxidativo, crónico y degenerativo y conservación de alimentos.

## X. CONCLUSIONES

1. Por medio de la validación de métodos se logró establecer metodologías eficaces para la evaluación de las actividades antiureasa, antitirosinasa y antioxidante.
2. La especie de *Piper* que presentó la mayor inhibición de la actividad tirosinasa fue *P. variable* con un valor de  $CI_{50}$  de 2.0  $\mu\text{g/mL}$  en el extracto diclorometánico, sin embargo ninguna presentó mejor  $CI_{50}$  comparado con el estándar.
3. La especie de *Piper* que presentó la mayor inhibición de la actividad ureasa fue *P. psilorachis* con un valor de  $CI_{50}$  de 1.9  $\mu\text{g/mL}$  en el extracto metanólico, sin embargo ninguna presentó mejor  $CI_{50}$  comparado con el estándar.
4. Las especies con mayor poder reductor de hierro según los valores obtenidos de  $CI_{50}$  son *P. psilorhachis* (2.1  $\mu\text{g/mL}$ ) y *P. variable* (2.6  $\mu\text{g/mL}$ ) en extracto metanólico.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Continuar con estudios de actividad inhibitoria de tirosinasa, inhibitoria de ureasa y antioxidante en otras especies nativas del genero *Piper*.
2. Emplear otros métodos que determinen actividad inhibitoria de tirosinasa, inhibitoria de ureasa y antioxidante para ampliar conocimientos y comparar de metodologías.
3. Realizar fraccionamientos bioguiados de las especies que presentaron mejor actividad inhibitoria de tirosinasa, inhibitoria de ureasa y antioxidante.
4. Establecer modelos in vivo y someter las especies de *Piper* estudiadas en la presente investigación para así comprobar los resultados.
5. Realizar por fraccionamiento bioguiado a los extractos activos que se desconoce su principio activo, con el fin de identificar la(s) molécula(s) responsable(s) de la actividad.
6. Evaluar otras partes de la planta para determinar si presentan actividad inhibitoria de tirosinasa, inhibitoria de ureasa y antioxidante y si existe diferencia en cuanto a su actividad.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdillahi, H., Finnie, J. & Standen, V. (2011). Anti-inflammatory, antioxidant, antityrosinase and phenolic contents of four *Podocarpus* species used in traditional medicine in south Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1), 496-503.
- Adeniyi, B & Anyiam, F. (2004). In vitro Anti- *Helicobacter pylori* Potential of methanol extract of *Allium ascalonicum*: Susceptibility and effect on urease activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 18 (1), 358-361.
- Agbor, G., Vinson, J., Sortino, J., Johnson, R. (2012) Antioxidant and anti-atherogenic activities of three *Piper* species on atherogenic diet fed hamsters. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7(2), 49-64.
- Ahmad, M. & Mahummad, N. (2008). Urease inhibitor from *Datisca cannabina* Linn. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 23(3), 386-390.
- Amtul, Z., Atta-ur-Rahman, R., Siddiqui A. & Choydhary M. (2002). Chemistry and mechanism of urease inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 9(1) 1323-1348.
- Arfan, M., Ali, M., Ahmad, H., Anis, I., Kham, A., Iqbal, M. & Raza, M. (2010). Urease inhibitors from *Hypericum oblongifolium* WALL. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25(2), 296-299.
- Badii, M., Garza, V., Landeros, J. & Quiroz, H. (2006). Diversidad y relevancia de los mosquitos. *CULCyT/Bionomía*, 3(3), 4-16.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q. & Bernard, P. (2002). Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), 155-158.

- Bonanni, A., Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E. & Tomassetti, M. (2007). Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods. *Food Chemistry*, 102(3), 751-758.
- Boveri, A. (1999). Antioxidantes: efectos biológicos y sobre el envejecimiento. *Folia Dermatológica Peruana*. 10 (4), 55-88
- Cáceres, A., Cruz, S., Gaitán, I., Guerrero, K., Álvarez, L. & Marroquín, N. (2012). Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of Piper species from Guatemala with potential use in natural product industry. *Acta Horticulturae*. 634, 77- 84.
- Cai, X., Lin, M., Shan, S., Qi, X., & Ying, Z. (2012). Curcumin inhibits melanogenesis in Human Melanocytes. *Journal of Ethnopharmacology* 26 (3), 174-179.
- Casañola, G., Marrero, Y., Hassan, M., Ather, A., Khan, K., Torrens, F. & Rotondo, R. (2007). Dragon method for finding novel tyrosinase inhibitors: Biosilico identification and experimental in vitro assays. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(1), 1370-1381.
- Céspedes, C., Valdez-Morales, M., Avila, J., Mohammed, E., Alarcón, J. & Paredes-López, O. (2010). Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild black-berry fruits, *Aristotelia chilensis* (Mol) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chemistry*, 119(3), 886-895.
- Chaudière, J. & Ferrari-Iliou, R. (1993). Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chemical Toxicological*, 37(10), 949-962.
- Chávez, F., Aranda, M., García, A. & Pastene E. (2011). Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 265-280.

- Chiari, M., Joray, M., Ruiz, G., Palacios, S. & Carpinella, M. (2010). Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. *Food Chemistry*, 120(1), 10-14.
- Cruz, S., Cáceres, A., Álvarez, L., Apel, M. & Henríquez, A. (2012). Chemical diversity of essential oils from 15 *Piper* species from Guatemala. *Acta Horticulturae*, 964, 39-46.
- Cruz, S., Cáceres, A., Álvarez, L., Morales, J., Apel, M., Henriques, A., & Gupta, M. (2011). Chemical composition of essential oils of *Piper jacquemontianum* and *Piper variabile* from Guatemala and bioactivity of the dichloromethane and metanol extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 587-593.
- Cruz, S., Samayoa, M., Cáceres, A., Gaitán, I., Molina, R. & Álvarez, L. (2005). Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de Piperaceae. *Tikalía*, 23(2), 51-67.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K. & Ven, M. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: Recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidant. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28(5), 771-799.
- Curto, E., Kwong, C., Hermersdorfer, H., Glantt, H., Santis, C., Virador, V. & Dooley, T. (1999). Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, 57(1), 663-672.
- Dasilba, A., Pillco, A., Flores, S., Quisbert, Gonzáles, E., Davalos, P., Bermejo, B. (2011). Genotoxic evaluation of essential oil and ethanolic extract of *Piper elongatum* Vahl. *Biofarbo*, 19 (2), 13-20.
- Dias dos Santos, P., Lima, D., Guimara, E. & Coelho, M. (2001) Essential oil analysis of 10 *Piperaceae* species from the Brazilian Atlantic forest. *Phytochemistry*, 58 (1), 547-551.



- Dominguez, X & Alcorn, J. (1985). Screening of medicinal plants used by huastec mayans of northeastern Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 13(2), 139-156.
- Dominguez, X., Verde, J., Sucar, S. & Treviño, R. (1986). Two amides from *Piper amalago*. *Phytochemistry*, 25(1), 239-240.
- Duckworth, H. & Coleman, J. (1969) Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(7), 1613-1625.
- Dyer, L. & Palmer, A. (2004). Biogeography of neotropical *Piper*. En R. Marquis (Ed.), *Piper: Model genus for studies of phytochemistry, ecology and evolution* (pp. 78-94). Washington D.C: Kluwer academic/plenum publishers.
- Fang, D., Tsuji, Y. & Setaluri, V. (2002). Selective down-regulation of tyrosinase family gene TYRP1 by inhibition of the activity of melanocyte transcription factor, MITF. *Nucleic Acids Research*, 30 (15), 3096-3106.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. & Araújo, M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1), 31-37.
- Galvez, L., Kwon, Y., Apostolidis, E. & Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101(6), 4676-4689.
- García, A., Leyva, M., Martínez, J. & Stashenko, E. (2007). Determinación de la composición química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (*Piperaceae*) difundida en la costa colombiana. *Scientia et Technica*, 33(13), 439-442.
- Gómez, A. (2008). *Caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de hoja de tres especies Piperaceas* (*P. jacquemontianum*, *P.*

- oradendron y *P. umbellatum*). Tesis de licenciatura de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Halliwell, B. & Grootveld, M. (1987). The measurement of free radical reactions in humans. *Biomedical Division*, 213(1), 9-14.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(3), 125-130.
- Hammer, D., Carson, C. & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
- Hassani, A., Ordonuzadeh, N., Ghaemi, A., Amirmozafari, N., Hamdi, K. & Nazari, R. (2009). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* urease with none and semi fermented *Camellia sinensis*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(1), 30-34.
- Hinneburg, I., Damien, H. & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 97(2), 122-129.
- Ibrar, A., Khan, I. & Abbas, N. (2013). Structurally diversified heterocycles and related privileged scaffolds as potential urease inhibitors: A brief overview. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 22(3), 423–446.
- Jenett-Siems, K., Mockenhaupt, K., Bienzle, U., Gupta, M. & Eich, E. (2002). In vitro antiplasmodial activity of central american medicinal plants. *Tropical Medicin and International Health*. 4 (9), 611-615.
- Juszkiewicz, A., Zaborska, A., Laptas, A., & Olech, Z. (2004). A study of the inhibition of jack bean urease by garlic extract. *Food Chemistry*, 85, 553-558.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T. & Jukic, M. (2004). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(3), 550-557.

- Kim, Y. M, Yun, J., Lee, C., Lee, H., Min, K. & Kim, Y. (2002) Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds, inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(18), 16340-16344.
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002). Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Kosem, N., Han, Y. & Moongkarndi, P. (2007). Antioxidant and cytoprotective activities of methanolic extract from *Garcinia mangostana* hulls. *Science Asia*, 33(1), 283-292.
- Kosikowska P. & Berlicki L. (2011). Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patient review. *Expert Opinion Ther Patients*, 21(6), 945-957.
- Krajewska, B. & Brindell M. (2011). Urease activity and L-ascorbic acid. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(3), 309-318.
- Kyeong, R., Kim, G., Hyun, C. Sang, D. & Ho, N. (2011). Compounds with tyrosinase inhibition, elastase inhibition and DPPH radical scavenging activities from the branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. *Phytotherapy Reserch*, 25(1), 1451-1456.
- Lee, K., Kim, B. J. & Kim, J. H. (1997). Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (1): Inhibitory activities of tyrosinase and DOPA auto-oxidation. *International Journal of Cosmetic Science*, 19(1), 291-298.
- Leyden, J., Shergill, B., Micali, D., Downie J, & Wallo, W. (2011). Natural options for the management of hyperpigmentation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 25(1), 1140–1145.
- Lim, T., Lim, Y.M. & Yule, C. (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*, 114(1), 594-599.

- Lin, Y., Hsu, F., Chen, C., Chern, J. & Lee, M. (2007). Constituents from the Formosan apple reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry*, 68(1), 1189-1199.
- Lock, O. (1988). *Investigación fitoquímica; métodos en el estudio de productos naturales*. (pp. 213). Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad del Perú.
- López, V., Akerreta, S., Cavero, R. & Calvo, I. (2007). Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*, 7(1), 43-47.
- Matsuda, H., Higashino, M., Nakai, Y., Kubo, M. & Lang, F. (1996). Studies of cuticle drugs from natural sources, inhibitory effects of some arctostaphylos plants on melanin biosíntesis. *Biology and Pharmacology Bulletin* 19(1), 153-156.
- Martínez, J., & Crespi, L (1997). Extracción mediante un SOXTEC® de la materia grasa de algodones procedentes de diferentes áreas productoras. Comparación extracción con diclorometano o sucesivas diclorometano-metanol. *Revista de Fitoterapia*, 48(4), 226-230.
- Martins, A., Salgueiro, I., Vila, R , Tomi, F., casanova, J. & Adzet, T. (1998) Essential oils from four *Piper* species. *Phytochemistry*, 49(7), 2019-2023.
- Mau, J., Lin, H., & Song, F. (2002). Antioxidant properties of several speciality mushrooms. *Food Research International*, 35(6), 519-526.
- Mensor, L., Menezes, F., Leitão, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C. & Leitão, S. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15(1), 127-130.
- Mesa, A., Toro, J., Cardona, F. & Blair, S. (2012). Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11(2), 154-162.

- Mesa-Vanegas, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Trujillo, S. & Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13-26.
- Mohd, A., Vimala, S., Abdull, A., Rohana, S., Jamaluddin, M. & Juliza, M. (2008). Antioxidant and antityrosinase properties of malasyan bamboo leaf extracts. *Journal of Tropical Forest Science*, 20(2), 123-131.
- Momtaz, S., Mapunya, B., Houghton, P., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S. & Lall, N. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 507-512.
- Myoda, T., Fujimura, S., Park, B., Nagashima, T., Nakagawa, J. & Nishizawa, M. (2010). Antioxidative and antimicrobial potential of residues of camu-camu juice production. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(2), 304-307.
- Nakashima, S., Matsuda, H., Oda, Y., Nakamura, S., Xu, F. & Masayuki, Y. (2010). Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(1), 2337-2345.
- Özer, O., Mutlu, B. & Kivcak, B. (2007). Antityrosinase activity of some plant extracts and formulations containing ellagic acid. *Pharmaceutical Biology* 45(6), 519-524.
- Palanisamy, U., Ling, L., Manaharan, V., Sivapalan, M., Subramaniam, T & Masilamani, T. (2011). Standardized extract of *Syzygium aqueum*: a safe cosmetic ingredient. *International Journal of Cosmetic Science*. 33 (2), 269–275.
- Palomo, I., Gutiérrez, M., Astudillo, L., Rivera, C., Torres, C. Guzmán, L., & Alarcón, M. (2009). Efecto antioxidante de frutas y hortalizas de la zona central de Chile. *Chile Nutrition*, 36(2), 152-158.

- Paulo, L., Oleastro, M., Gallardo, E., Antonio, J. & Dominguez, F. (2011). Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Research International*, 44(1), 964-969.
- Plazas, E., Cuca, L. & Delgado, W. (2008). Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* y derivados acetilados. *Revista Colombiana de Química*. 37 (2), 135-144.
- Puertas-Mejía, M., Gómez-Chabala, L., Rojano, B. & Sáez-Vega, J. (2009). Capacidad antioxidante *in vitro* de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 1-11.
- Quilez, A., Berenguer, B., Gilardoni, G., Souccar, C., Mendoca, S., Oliveira, L. & Vidari, G. (2010). Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpunya* Ruiz & Pav. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 583-589.
- Quintanar, E. & Calderón, J. V. (2009). La Capacidad Antioxidante Total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, N. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Roersch, C. (2010). *Piper umbellatum* L: A comparative cross-cultural analysis of its medicinal uses and an ethnopharmacological evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(2), 1-16.
- Rout, S. & Banerjee, R. (2007). Free radical scavenging, anti-glycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *punica granatum*. *Bioresource Technology* 98(1), 3159-3163.
- Saboury, A., Poorakbar, E. & Rezaei, G. (2010). A calorimetric study of the interaction of silver ions with jack bean urease. *Turkish Journal of Chemistry*, 34(1), 631-634.

- Salcedo, P. A. & García, M. D. (1998). Sistemas antioxidantes. *Fibrosis Quística* (pp. 56-57). Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Sánchez, C., Martínez, S. & Faure, G. (2011). Efecto protector de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. sobre el daño oxidativo a proteínas y ADN. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 1-12.
- Sánchez, V. P. (2001). *Flórula Del Parque Nacional Cahuita*. San José EUNED.
- Sánchez, Y. A., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E. & Iglesia, A. (2009). Estudio Químico y Microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de Anís). *Protección Vegetal*, 24(1), 39-46.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos* (pp.150-152) Bogotá: Cooperación Iberoamericana.
- Santos, M., Silva, A., Lima, R., Lima, D., Sallet, L., Teixeira, C., Polli, A. & Facundo, A. (2010) Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). *Revista Brasil*, 33 (2), 919-324.
- Shi, D., Liu, Y., Liu, W. & Gu, F. (2010). Inhibition of urease by extracts derived from 15 Chinese medicinal herbs. *Pharmaceutical Biology*, 49(7), 752-755.
- Skoog, D., West, D., Holler, F. & Crouch, S. (2005). *Fundamentos de Química Analítica* (pp. 1014). Guadalajara: Thomson.
- Standley, P. & Steyermark, J. (1952). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24(3), 275-337.
- Standley, P. & Williams, L. (1976). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany*, 24(1), 331-332.
- Stohs, S. & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine*, 18(2), 321-336.
- Tabak, M., Armon, R., Potasman, I. & Neeman, I. (1996) *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 667-672

- Tanaka, T., Kawase, M. & Tani, S. (2003).  $\alpha$ -Hidroxicetones as inhibitors of urease. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 12(1), 501-505.
- Tirzitis, G. & Bartosz, G. (2010). Determination of antyiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *The Journal of the Polish Biochemical Society*, 57(1), 139-142.
- Tripathi, R., Hearing, V., Urabe, K., Aroca, P. & Spritz, R. (1992). Mutational mapping of the catalytic activities of human tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23707–23712.
- Ul-Haq, A., Malik, A., Khan M., Ul-Haq, A., Khan, S., Ahmad, A. & Choudhary, M. (2006). Tyrosinase inhibitory lignans from the methanol extract of the roots of *Vitex negundo* Linn and their structure–activity relationship. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(1), 255-260.
- Valenzuela, A., Sanhueza, J. & Nieto, S. (2003). Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Revista Cubana Medicina Militar*. 54 (3), 295-303.
- Velásquez, E., Tournier, H., Mordujovich, P., Saavedra, G. & Schinella, G.R. (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*, 74(1), 91-97.
- Veliz, R., Cruz, V., Gómez, A., García, V., Álvarez, L., Cáceres, A., & Gaitán, I. (2006). Caracterización de aceites esenciales y extractos de ocho especies mesoamericanas de *Piperaceas* y evaluación de la actividad de la biocida para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales. Instituto de investigaciones Química y Biológicas (IIQB). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Vertuani, S., Angusti, A. & Manfredi, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10(1), 1677-1694.



- Vincent, P. (1981) El Cuerpo Humano. *Excreción: Hígado y riñones*. (pp. 250-294) Madrid: Editorial Reverte.
- Voet, D., Charlotte, W., Pratt, E., (2007). Fundamentos de Bioquímica. (pp. 345- 356) Madrid: Editorial Panamericana.
- Wang, H., Chen, C., Chen, C.Y., Ho, M., Chou, Y., Chang, H.C. & Chu, I.(2010). N-Formylanonaine from *Michelia alba* as a human tyrosinase inhibitor and antioxidant. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(1), 5241-5247.
- Yasmeen, R., Hashmi, A., Anjum, A., Saeed, S & Muhammad, K. (2005). Antibacterial activity of indigenous herbal extracts against Urease producing bacteria. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 22(2) 416-419.
- Zhou, K., Wang, H., Mei, W., Li, X., Luo, Y. & Dai, H. (2011). Antioxidant Activity of Papaya Seed Extracts. *Molecules*, 16(8), 6179-6192.

### XIII.ANEXOS

#### DOCUMENTACIÓN FOTOGRÁFICA

**Fotografía 1.** Recolecta de material vegetal.



Recolecta de materia vegetal en Ecoparcela El Kakawatal,  
Samayac, Suchitepéquez.

**Fotografía 2.** Secado de material vegetal y obtención de extractos



Secado de material vegetal en Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA, S.A y obtencion de extractos diclorometanólicos y metanólicos en LIPRONAT y Departamento de Citohistologia.

**Fotografía 3.** Obtención de extractos



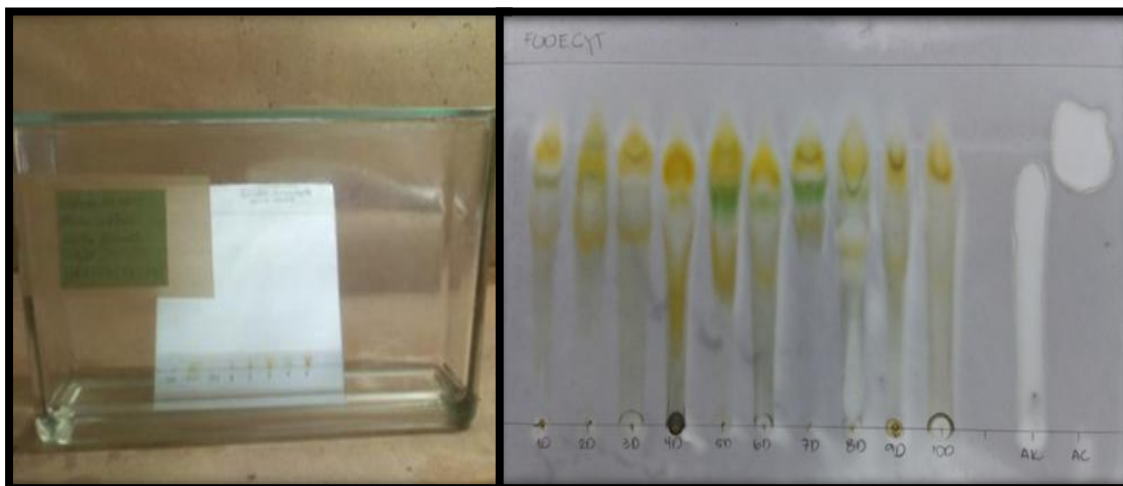
Extractos condensados, luego de unas semanas dentro de la secadora con silica gel.

**Fotografía 4.** Realización de pruebas para evaluar actividad antioxidante y actividad inhibitoria de tirosinasa y ureasa



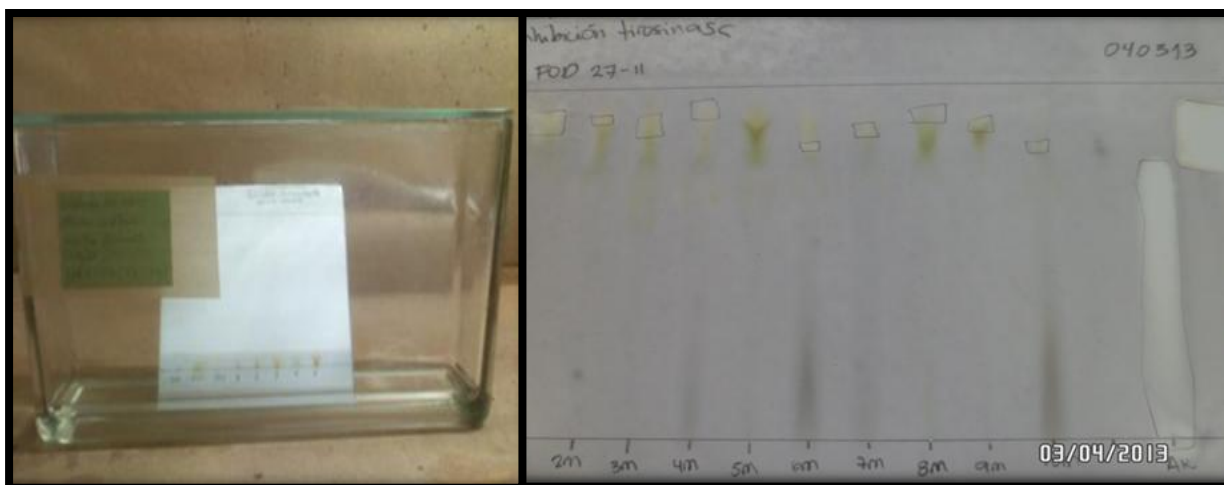
Realización de pruebas en LIPRONAT y Departamento de Citohistología.

**Fotografía 5.** Determinación de la actividad inhibitoria de la tirosinasa de los extractos diclorometanólicos por medio de la técnica cualitativa Cromatografía en Capa Fina (TLC)



Se observan los extractos diclorometanólicos en la fase móvil de la cromatopla y su revelación, todos los extractos, presentan actividad inhibitoria de la tirosinasa, se observa la coloración blanquecina en las bandas respectivas.

**Fotografía 6.** Determinación de la actividad inhibidora de la tirosinasa de los extractos metanólicos por medio de la técnica cualitativa Cromatografía en Capa Fina (TLC)



Se observan los extractos metanólicos en la fase móvil de la cromatopla y su revelación, en los extractos, presentan actividad inhibidora de la tirosinasa se observa la coloración blanquecina en las bandas respectivas.

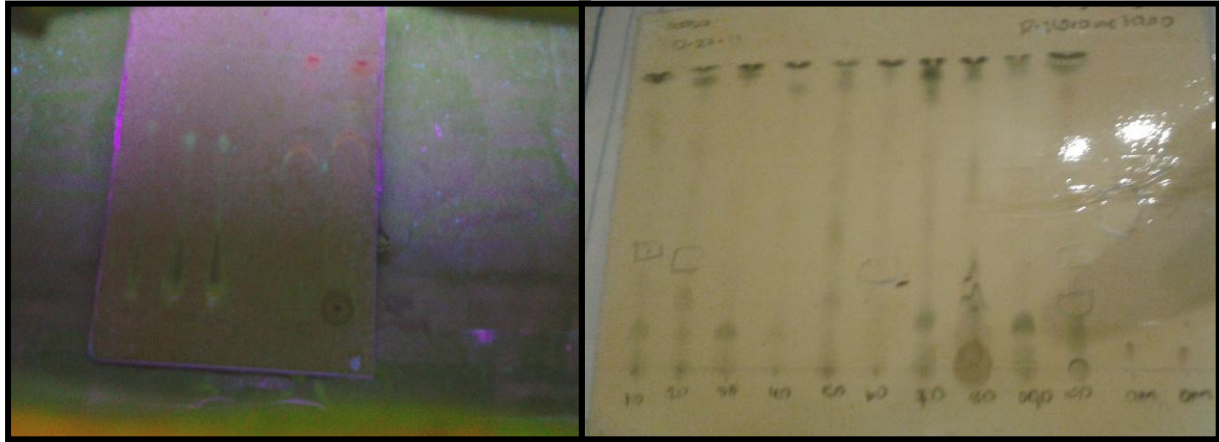
**Cuadro 1.** Ecuación de la recta de los resultados obtenidos con el método micrométrico de tirosinasa de extractos diclorometanólicos y metanólicos

No.	Especie	Disolvente	Ecuación de la recta
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	Y=0.10x+4.81 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.06x+0.37 R <sup>2</sup> = 0.98
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	Y=0.04x+1.00 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.02x+3.33 R <sup>2</sup> = 0.98
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	Y=0.03x+0.11 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.06x+1.07 R <sup>2</sup> = 0.97
4	<i>P. jacquemontianum</i>	MetOH	Y=0.08x+7.73 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.05x+1.71 R <sup>2</sup> = 0.97
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	Y=0.04x+2.40 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.06x+2.67 R <sup>2</sup> = 0.98
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	Y=0.09x+2.52 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.03x+7.37 R <sup>2</sup> = 0.97
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	Y=0.03x+4.0 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.04x+3.67 R <sup>2</sup> = 0.98
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	Y=0.03x+5.57 R <sup>2</sup> = 0.99
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.05x+2.79 R <sup>2</sup> = 0.99
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	Y=0.05x+7.55 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.08x+10.11 R <sup>2</sup> = 0.98
10	<i>P. variable</i>	MetOH	Y=0.05x+22.04 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.07x+24.68 R <sup>2</sup> = 0.99

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología EAK: Equivalentes de ácido kójico por mg de extracto

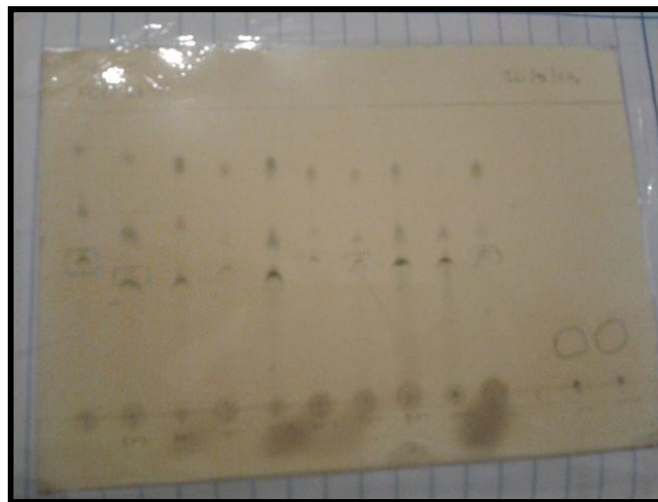
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología.

**Fotografía 7.** Determinación de la actividad inhibidora de la ureasa de los extractos diclorometánicos por medio de la técnica cualitativa Cromatografía en Capa Fina (TLC)



Detección: Los extractos diclorometanólicos, en los que presentan actividad inhibidora de la ureasa, se observa la coloración en las bandas respectivas.

**Fotografía 8.** Determinación de la actividad inhibidora de la ureasa de los extractos metanólicos por medio de la técnica cualitativa Cromatografía en Capa Fina (TLC)



Detección: Los extractos metanólicos, en los que presentan actividad inhibidora de la ureasa, se observa la coloración en las bandas respectivas.

**Cuadro 2.** Ecuación de la recta de los resultados obtenidos con el método micrométrico de ureasa de extractos diclorometanólicos y metanólicos

No.	Especie	Disolvente	Ecuación de la recta
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	Y=0.042x+22.47 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.032x+21.29 R <sup>2</sup> = 0.98
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	Y=0.045x+22.56 R <sup>2</sup> = 0.96
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.057x+20.95 R <sup>2</sup> = 0.98
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	Y=0.048x+20.70 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.042x+22.39 R <sup>2</sup> = 0.97
4	<i>P. jacquemontianum</i>	MetOH	Y=0.047x+22.00 R <sup>2</sup> = 0.96
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.026x+22.53 R <sup>2</sup> = 0.99
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	Y=0.061x+19.97 R <sup>2</sup> = 0.99
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.126x+13.79 R <sup>2</sup> = 0.97
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	Y=0.049x+22.27 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.0256x+26.58 R <sup>2</sup> = 0.97
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	Y=0.049x+23.83 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.025x+26.58 R <sup>2</sup> = 0.98
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	Y=0.072x+17.34 R <sup>2</sup> = 0.99
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.0967x+23.15 R <sup>2</sup> = 0.98
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	Y=0.058x+19.09 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.026x+22.53 R <sup>2</sup> = 0.99
10	<i>P. variable</i>	MetOH	Y=0.059x+22.04 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.045x+22.53 R <sup>2</sup> = 0.99

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología



**Cuadro 3.** Ecuación de la recta de los resultados obtenidos de oxidación de hierro con el método FRAP de extractos diclorometanólicos y metanólicos.

No.	Especie	Disolvente	Ecuación de la recta
1	<i>P. amalago</i>	MetOH	Y=0.40x+6.81 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.06x+0.77 R <sup>2</sup> = 0.98
2	<i>P. auritum</i>	MetOH	Y=0.14x+0.89 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.02x+3.33 R <sup>2</sup> = 0.98
3	<i>P. hispidum</i>	MetOH	Y=0.89x+0.15 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.12x+1.00 R <sup>2</sup> = 0.97
4	<i>P. jacquemontianum</i>	MetOH	Y=0.10x+6.78 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.55x+1.81 R <sup>2</sup> = 0.97
5	<i>P. oradendron</i>	MetOH	Y=0.94x+2.10 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.67x+1.67 R <sup>2</sup> = 0.98
6	<i>P. psilorhachis</i>	MetOH	Y=0.19x+2.22 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.23x+2.37 R <sup>2</sup> = 0.97
7	<i>P. retalhuleuense</i>	MetOH	Y=0.09x+1.45 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.05x+1.67 R <sup>2</sup> = 0.98
8	<i>P. sempervirens</i>	MetOH	Y=0.53x+5.23 R <sup>2</sup> = 0.99
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.25x+1.79 R <sup>2</sup> = 0.99
9	<i>P. umbellatum</i>	MetOH	Y=0.12x+6.32 R <sup>2</sup> = 0.98
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.09x+12.1 R <sup>2</sup> = 0.98
10	<i>P. variable</i>	MetOH	Y=0.45x+2.04 R <sup>2</sup> = 0.97
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Y=0.77x+4.68 R <sup>2</sup> = 0.99

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Departamento de Citohistología

Hirma Fabiana Almeda Tablas  
**Autora**

Laura María Astorga Domínguez  
**Autora**

Andrea del Carmen Orellana Urrutia  
**Autora**

Ligia Isabel Sampuel Guzmán  
**Autora**

Paola Alejandrina Sierra Illescas  
**Autora**

Lic. Armando Cáceres  
**Asesor**

Licda. Isabel Gaytán  
**Revisora**

MSc. María Eugenia Paredes  
**Directora**

Dr. Oscar Cobar Pinto  
**Decano**