

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III.1 MATERIALES, EQUIPOS, INSTRUMENTOS Y REACTIVOS

Del estudio botánico:

- Especie *Peperomia scutellaefolia R. et P.*, planta completa y fresca.
- Trinocular stereo zoom. Marca: Beltec scientific. Model XLT-500B.
- Advanced grade microscopes. Marca: Beltec scientific. Model L2000A.
- Sistema de video-microscopía con conexión a PC. Beltec scientific. Modelo 480B.
- Colorante verde de malaquita (1% alcohólico)
- Colorante safranina (1% alcohólico)
- Sol. de NaClO (20%)
- Gelatina glicerizada.
- Médula de saúco.
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Placas Petri, cuchillas.

Del estudio químico

- Espectrómetro ultravioleta visible. (UV – VIS) Marca: Perkin Elmer. Modelo: LAMBDA 40P
- Espectrómetro infrarrojo con transformadas de Fourier. (FT - IR) Marca: Nicolet. Modelo: IMPACT 410.
- Lámparas UV 254 nm y 366 nm.
- Balanza analítica Mettler.
- Molino de cuchillas Willey Will St. Model N° 3.
- Equipo para efectuar cromatografías en capa fina.
- Reactivos de identificación: cloruro férrico (1%), magnesio metálico, acetato de zinc, Rvo. ninhidrina, solución de gelatina-sal, Rvo. Liebermann-Burchard, Rvo. Dragendorff.
- Silica gel 60F Merck y Kieselgel (0.05 – 0.2 mm) Merck
- Solventes: metanol, etanol, agua, cloroformo, n-hexano.
- Ácido acético glacial, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico concentrado.
- Material de vidrio de uso general en laboratorio.

Del estudio farmacológico

a) De la investigación etnofarmacológica

- Fotos de la planta fresca completa.
- Tallos subterráneos frescos y secos (forma en que son comercializados en los mercados)
- Formatos de las encuestas y cuaderno de notas.

b) Del test de cicatrización

- Extracto hidroalcohólico total de *Peperomia scutellaefolia R. et P.*
- 96 ratones albinos machos, cepa Balb C 53, de 2 meses de edad, 25 + 2.8 g de peso.
- Dinamómetro (equipo de tensión con arena).
- Neomicina, bacitracina, glicina, L - cisteína, DL - treonina, (Cicatrín).
- Gel Carbopol 940, trietanolamina, propilenglicol, y H₂O desionizada.
- Crema depilatoria Opilca.
- Pentobarbital sódico (Halatal, medicamento veterinario)
- Estiletes N° 11, jeringa y agujas para inyección intraperitoneal, material de vidrio diverso.

c) De la evaluación Histológica.

- Tejidos con cicatrizaciones experimentales (muestra obtenida inmediatamente a la muerte de los animales)
- Advanced grade microscopes. Marca: Beltec scientific. Model L2000A.
- Sistema de video-microscopía con conexión a PC. Beltec scientific. Modelo 480B.
- Micrótomos (con cuchillas de acero, produce cortes de 5 - 10 micrómetros de espesor).
- Formaldehído (10%), agua destilada, parafina, xilol; mezcla de colorantes hematoxilina-eosina para histología, albúmina, glicerina, bálsamo de Canadá.
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos, pinzas y otros.

III.2- METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

III.2.1 DEL ESTUDIO BOTÁNICO

III.2.1.1 Clasificación sistemática.

Fue determinada según el sistema de clasificación de Engler y Prantl, modificado por Melchior, en 1964. Dicha clasificación se realizó en el Museo de Historia Natural “Javier Prado” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

III.2.1.2 Descripción macroscópica y microscópica de la especie.

Se escogieron plantas completamente desarrolladas en etapa de floración, el estudio morfológico externo se hizo examinando la planta en directo y utilizando un estéreomicroscopio para observar la inflorescencia.

Para el estudio anatómico se realizaron cortes transversales a mano libre de hoja, pecíolo, y tallo, los cuales fueron observados en microscopio óptico.

Corte transversal de la hoja, las muestras usadas en el seccionamiento transversal de la hoja fueron retiradas de la porción comprendida entre el nivel medio y el tercio inferior de la lámina foliar, en la porción seleccionada, se realizaron los cortes de la nervadura principal y de las secundarias. Estos cortes fueron observados directamente, y también fueron aclarados con NaClO (20%), y coloreados con verde de malaquita. Luego fueron montados en láminas portaobjetos con gelatina glicerizada. Estas láminas fueron observadas a 40x, 100x, y 400x aumentos. Las imágenes fueron microfografiadas con un sistema de video-microscopía con conexión a PC.

Corte transversal del pecíolo, la porción media del pecíolo, fue incluida en médula de saúco, para poder realizar el corte con navaja. Estos cortes fueron observados directamente a 100x aumentos, con el mismo equipo mencionado anteriormente.

Corte transversal del tallo subterráneo, el tallo es cortado en cuatro partes simétricas, debido a su forma esférica, a partir de una de estas secciones se elaboraron los cortes con navaja. Estos cortes fueron aclarados con NaClO (20%) y coloreados con safranina alcohólica (1%), y montados en las láminas de vidrio, para su posterior observación y microfografiado.

III.2.2 DEL ESTUDIO QUÍMICO

III.2.2.1 Recolección, secado, molienda y extracción de los metabolitos secundarios de la especie.

Los tallos subterráneos; crecen de manera silvestre en los distritos de Namora, Encañada, y Llacanora, en la provincia de Cajamarca, a una altitud entre 3000 y 4000 m.s.n.m. la recolección, se realizó en el mes de septiembre cuando la especie se encontraba en etapa de floración. *Peperomia scutellaefolia R. et P.* crece en tierra seca y rocosa; el tallo subterráneo se encuentra entre 1 - 2 cm. bajo tierra.

. Estos ejemplares fueron confrontados con los del Herbario del Museo de Historia Natural “Javier Prado” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se continuó con la limpieza exterior del material recolectado: se lavó cada tallo subterráneo (cormo); con agua corriente y una escobilla retirando todo residuo de tierra y las raíces laterales, luego se escurrió y estabilizó con alcohol etílico. Se desecaron los tallos y fueron molidos en un molino de cuchillas, y tamizado con malla N°3, obteniéndose un polvo seco y homogéneo.

El polvo seco fue macerado en solución hidroalcohólica (EtOH 96° G.L.) por 7 días en oscuridad, luego fue filtrado con una gasa, el líquido filtrado fue concentrado, resultando el **extracto hidroalcohólico total**; a partir de este extracto se separaron cuatro fracciones por flash chromatographic. (cromatografía en columna rápida)

Para realizar la separación por **flash chromatographic** (cromatografía en columna rápida), se pesaron 5 g. del extracto hidroalcohólico bruto, se agregaron 5g de Kieselgel 0.05 – 0.2 mm (para cromatografía en columna), se mezcló hasta homogeneizar. Esta mezcla fue depositada en un embudo Buchner, sobre un papel Wathman, encima se coloca otro papel, el equipo es armado según esquema, y con ayuda de la bomba de vacío, los solventes van extrayendo los metabolitos, en orden de polaridad creciente, empezando por el n-hexano (húmedo), siguió el cloroformo, el metanol y finalmente el agua, se utilizaron 100 mL de cada solvente. Estos extractos fueron concentrados obteniéndose finalmente: fracción n-hexánica (húmeda), fracción clorofórmica, fracción metanólica, y fracción acuosa.

III.2.2.2 Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica.

Marcha de solubilidad: En 4 tubos de ensayo se colocó una pequeña porción del extracto hidroalcohólico total de los tallos subterráneos y se le agregó a cada uno 2 mL del solvente respectivo H₂O, MeOH, CHCl₃, y n-hexano, se agita y se observan los resultados.

Marcha fitoquímica: Se realizaron las siguientes reacciones químicas preliminares en el extracto hidroalcohólico total:

Reacción con FeCl₃ (1 % en H₂O) – Es característica para compuestos fenólicos resultan coloraciones verdes a marrón para derivados de catecol, y coloraciones azuladas para derivados de pirogalol.

Reacción con gelatina / NaCl (1g de gelatina + 100 ml H₂O + 10g NaCl) - Un precipitado abundante indica presencia de taninos.

Reacción de Shinoda – En una lamina para reacción a la gota, se deposita una solución poco coloreada del extracto vegetal, se agregan pequeños trozos de Mg. metálico y gotas de HCl concentrado, las coloraciones que se generan indican la presencia y tipo de flavonoide. En la Tabla N°1 se encuentran las coloraciones características de los flavonoides frente a la reacción de Shinoda.

Reacción de Dragendorff (Yoduro de Bismuto y Potasio) – Un precipitado o coloración rojo naranja, indica presencia de alcaloides.

Reacción de Mayer (Yoduro de Mercurio y Potasio) - Un precipitado blanco inmediato, indica presencia de alcaloides.

Índice afrosimétrico o prueba de la espuma - Para detectar la presencia de saponinas; en un tubo de ensayo, se depositan 0.5 g del extracto vegetal, y 10 mL de agua destilada. Agitar por 30 segundos, se considera positiva si la altura de la espuma es mayor a 5 mm después de los 15 minutos de su aparición.

Reacción de Liebermann–Burchard - A 1 mg del extracto se le agregan pocas gotas de ácido acético + 3 ml de Ac₂O/H₂SO₄ (50:1). Una coloración verde ó azul verdoso (vía rojo ó azul), indica presencia de un núcleo esteroidal o triterpenoidal.

III.2.2.3 Análisis cromatográfico.

Los extractos obtenidos a partir de la cromatografía en columna rápida, se controlaron por cromatografía en capa fina analítica, usándose como soporte cromatoplacas de sílica gel F60 de 20 cm x 20 cm, de 2 mm de espesor. Como fases móviles se utilizan mezclas de solventes, detalladas mas adelante. Estas placas fueron reveladas con: Rvo. Dragendorff, Rvo. FeCl_3 , Rvo. Liebermann–Burchard, H_2SO_4 concentrado, luz UV de 254 nm y 366 nm. Se realizaron sucesivas cromatografías a escala preparativa, y se consiguió separar las fracciones en componentes individuales para su posterior evaluación espectrofotométrica.

III.2.2.4 Análisis espectrofotométrico.

Después de ser aisladas fueron analizadas 7 fracciones por espectroscopia ultravioleta y espectroscopia infrarroja provenientes de los extractos metanólico y n-hexánico. El espectro UV de las fracciones fue leído en MeOH, y el espectro infrarrojo en láminas de NaCl.

El método completo de extracción de productos naturales aplicado en esta investigación se encuentra detallado en la Fig. N°6.

III.2.3 ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

III.2.3.1 Elaboración y aplicación de la encuesta etnofarmacológica.

El cuestionario utilizado fue la ficha de referencias etnobotánicas según Alban, 1985 (53); al cual se añadieron algunas preguntas de interés, que fueron:

- ¿Usa la planta sola, o con otros recursos?
- ¿Cómo aprendió lo que sabe sobre plantas medicinales?
- ¿Cómo obtiene las plantas medicinales?
- ¿Usa medicamentos de marca, junto con plantas medicinales? ; ¿Cuándo?

Resultando 13 preguntas sobre la planta medicinal y su importancia en la medicina tradicional de Cajamarca. (Anexo N°1)

La zona específica de trabajo fue la provincia de Cajamarca que se encuentra en la parte sur del departamento de Cajamarca, abarcando una extensión de 4 898 Km², limita con el departamento de La Libertad y las provincias de Contumazá, San Pablo, Hualgayoc, Celendín, San Marcos y Cajabamba. La capital es la ciudad de Cajamarca situada a 2700 m.s.n.m. de altitud. El clima es seco templado, soleado durante el día y frío en las noches, la temperatura media anual es de 13.2 °C (máxima media: 21.4°C y mínima media: 5°C), la estación de lluvias de diciembre a marzo. (14). Figura N°7.

Para realizar las entrevistas, se utilizaron estímulos visuales como el material vegetal fresco, y también fotos de la planta completa.

Los participantes fueron tomados al azar considerando como únicos requisitos, que fueran personas adultas y habitantes de la zona en estudio. De esta forma se logró entrevistar a las personas que practican la medicina tradicional en Cajamarca (curanderos, curiosos, yerberos, herbolarios) y a la población en general.

Con este cuestionario, se ha recopilado información sobre los nombres vernáculos, usos, preparación, vías de administración, formas de aplicación, parte empleada de la planta, y también la clasificación popular de las plantas medicinales en: Cálido, Cordial, y Fresco:

Cálido.- ‘Se utiliza cuando se tiene una dolencia que genera frío en el cuerpo (sensación); estas plantas son cálidas porque compensan esta sensación y dan calor cuando se las usa.’

Cordial.- ‘Una planta Cordial, no genera frío ni calor, pero repone el equilibrio del cuerpo, son usadas en muchas enfermedades.’

Fresco.- ‘Son plantas que refrescan, cuando se tiene una dolencia que hace sentir quemazón, dan sensación de frescura.’

Aunque los datos obtenidos, no son representativos con respecto al número de habitantes, se intentó incrementar la credibilidad considerando las aplicaciones medicinales de la planta Munyu Munyu, en los siguientes casos:

– El colector experimentó directamente su uso.

- El informante usó u observó su uso.

- El informante escuchó o conoce de sus ancestros el uso de la planta.

III.2.3.2 Preparación de los extractos y geles.

(1) **Preparación del extracto hidroalcohólico total:** Se trabajo con el extracto hidroalcohólico total, obtenido por los procedimientos ya detallados en III.2.2.1.

(2) Preparación de los geles:

(i) Se preparo una suspensión coloidal de Carbopol 940 al 1% en agua desionizada. Con 24 horas de anticipación para lograr una buena hidratación, esta solución coloidal tiene un pH=3,0.

(ii) Para la incorporación del principio activo se efectúa la disolución de este en una fracción de la solución coloidal, se agregaron unas gotas de propilenglicol, con esto se consiguió solubilizar el extracto y proteger de la deshidratación al gel.

(iii) Finalmente se neutraliza con gotas de trietanolamina (99%); homogeneizando hasta que adquiera características de gel o pH = 6.5 (46).

(iv) Con este procedimiento se prepararon los siguientes tratamientos gel al 5% P/P, gel al 10% P/P, gel al 20% P/P, gel al 30% P/P, y gel solo.

III.2.3.3 Test de cicatrización

Fundamento: Se fundamenta en la adición de la fuerza de tensión (medida en gramos), necesaria para abrir una herida de 1 cm. de longitud producidas en el lomo de ratón. Modelo de referencia de Howes et al. (37).

Forma de Dosaje: Con el extracto hidroalcohólico total seco, se prepararon geles al 5%, 10%, 20%, 30%, P/P en una base bioadhesiva de ácido poliacrílico (Carbopol 940) al 1%.

Técnica Operatoria: Se utilizó el método de Vaisberg y col (2). 96 ratones albinos machos, cepa Balb C 53, de 2 meses de edad, 25 + 2.8 g de peso ratones albinos, provenientes del bioterio del Centro nacional de producción de biológicos, fueron distribuidos al azar en 8 grupos de 12 cada uno. Se mantuvieron en observación por 48 horas, verificándose la condición optima de los ratones para el estudio, luego se les depiló la mitad inferior del lomo, después de 24 horas, al no observarse irritaciones en la piel, se realizaron incisiones de 1 cm. de longitud en el tercio inferior del lomo, paralelo a la columna lumbar.

Posteriormente se administraron los tratamientos cada 12 horas por 72 horas, reservando al grupo control que no recibió tratamiento. Se mantuvo la misma alimentación, ventilación, y T° en todos los grupos. Después de las 72 horas se sacrificaron los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal; luego se realizó la medición de los gramos (g), necesarios para abrir cada herida cicatrizada con un

Elaboración y formato en Pdf, por la Oficina General de Sistema de Bibliotecas y Biblioteca Central.

dinamómetro (utilizándose arena en el dinamómetro, para generar la fuerza de tensión sobre la herida).

III.2.3.4 Histología de los tejidos (preparación tisular)

Las muestras de tejido con cicatrices experimentales fueron obtenidas inmediatamente a la muerte de los animales, seccionando un área de 2 cm ancho x 2.5 cm largo, estos tejidos fueron sujetados cuidadosamente en trozos de tecnopor, para evitar el enrollamiento natural del tejido separado, y depositados en una solución de formaldehído amortiguado neutro al 10% para lograr la **Fijación** que conserva una imagen del tejido, como si estuviera vivo, luego vienen la **Deshidratación** con soluciones de concentraciones crecientes de etanol y el **Aclaramiento** del tejido (se vuelve transparente) con xilol, después, para poder hacer los cortes se realiza la **Infiltración** o inclusión en parafina, formándose un bloque sólido, la etapa siguiente es el **Corte** que se realiza en un micrótopo, a continuación se hace el **Montaje** en una lamina portaobjetos cubierta con un material adherente (albúmina de huevo), luego se retira la parafina restante con xileno, después se realiza la **Tinción** en este caso con hematoxilina-eosina, después se **Rehidrata** con soluciones de concentraciones decrecientes de etanol, de modo que pueda fijarse con un medio de montaje como el bálsamo de Canadá, que tiene un índice de refracción similar al del vidrio, se cubre con un cubreobjetos y se sella con esmalte transparente. (54)

En la Fig. N°8 se encuentra el diagrama de flujo completo de la presente investigación, donde se puede observar el orden secuencial de los procedimientos anteriormente expuestos.