

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



INFORME DE PRÁCTICAS PRE-PROFESIONALES

**Evaluación de la toxicidad en *Artemia salina* del extracto acuoso de las hojas de
*Piper aduncum L.***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR:

Br. VACA MEZA, Eveleny Tirsá

ASESORA:

Dra. MARÍN TELLO, Carmen Luisa

TRUJILLO - PERÚ

2019

DEDICATORIA

A DIOS

Por brindarme sabiduría día a día, y poder así desarrollarme dentro de mi carrera, e iluminar mi mente y cuerpo para enfrentar los retos de la vida.

A MIS PADRES: ROSA LAIZA, COSME FLORES, SEGUNDO VACA

Por ser los pilares de mi vida, criarme y guiarme en el camino correcto a través de sus enseñanzas.

A MI FAMILIA: JOSE, CARLOS, ERNESTO

CARMEN, DAVID Y JUANA

Por ser siempre el apoyo moral de mi vida, y estar incondicionalmente en cada momento de felicidad y derrotas en mi camino.

A MIS AMIGOS

Cada uno de ustedes que llegaron a formar parte de la historia de mi vida, han sido un granito para conformar esa montaña de amistad y amor que sigue creciendo en mi ser.

AGRADECIMIENTO

A MIS MENTORES:

Q.F. Carmen Marín Tello

I.Q. Noé Costilla Sánchez

Por la dedicación, guía y por brindarnos su valioso tiempo para el desarrollo de nuestro trabajo.

Gracias por brindarnos su amistad y sus conocimientos académicos y ser los consejeros principales en el transcurso de nuestra formación profesional.

RESUMEN

Las plantas son una fuente de diversidad natural que se viene utilizando como tradición heredable a través de cuantiosas generaciones. El objetivo del estudio fue determinar la toxicidad de las fracciones diluidas, obtenidas del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum L.* (matico) procedentes del Distrito de Cachicadán. En este estudio, hojas de *Piper aduncum L.* se seleccionaron para probar la actividad de letalidad en los nauplios de *Artemia salina* en salmuera de las diluciones del extracto en las concentraciones de 5000, 1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88 ug/ml basándose en el método de Miller y Tainter (1944) realizando el recuento de *Artemia salina* en estadio de nauplios después de las 24 horas. Como resultado se obtuvo la concentración letal 50 (CL50) del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum L.* fue 2751.11 ug/ml. Se concluye que el extracto acuoso de las hojas *Piper aduncum L.* (matico) en larvas de *Artemia salina* fue relativamente inocuo o no tóxico.

Palabra clave: *Piper aduncum L.*, *Artemia salina*, concentración letal 50.

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO

Dando cumplimiento con las disposiciones vigentes del Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, someto a vuestra noble consideración y elevado criterio el presente Informe de prácticas pre-profesionales intitulado:

“Evaluación de toxicidad (BRINE SHRIMP LETHALITY BIOASSAY) del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum L.*”

Es propicia la oportunidad para manifestarle el más sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y toda su plana docente que con su capacidad, buena voluntad y enseñanzas que se imparten día a día, contribuyen positivamente a mi formación profesional.

Mencionado todo lo sentido, señores del Jurado dejo a vuestra consideración la calificación del presente trabajo.

Trujillo, Julio del 2019



Eveleny Tirska Vaca Mcza

JURADO DICTAMINADOR



Dr. José Lizardo Cruzado Razco

PRESIDENTE



Dra. Carmen Luisa Marín Tello

ASESORA



Segundo Guillermo Ruiz Reyes

MIEMBRO

ABSTRACT

Plants are a source of natural diversity that has been used as a heritable tradition through large generations. The objective of the study was to determine the toxicity of the diluted fractions obtained from the water extract of the leaves of *Piper aduncum L.* (matico) from the District of Cachicadán. In this study, leaves of *Piper aduncum L.* were selected to test the lethality activity in the *Artemia salina* nauplii in brine from the extract dilutions at the concentrations of 5000, 1250, 312.5, 78.1, 19.5, 4.88 ug / ml based on in the method to Miller and Tainter (1944) performing the count of *Artemia salina* in nauplii stage after 24 hours. As a result, the lethal concentration 50 (LC50) of the water extract of the leaves of *Piper aduncum L.* was 2751.11 ug / ml. It is concluded that the water extract of the leaves *Piper aduncum L.* (matico) in larvae of *Artemia salina* was relatively innocuous or non-toxic.

Keyword: *Piper aduncum L.*, *Artemia salina*, lethal concentration 50.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO.....	i
DEDICATORIA.....	iii
PRESENTACIÓN.....	v
JURADO DICTAMINADOR.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN	8
II. MATERIAL Y MÉTODO	11
III. RESULTADOS	16
IV. DISCUSIÓN	19
V. CONCLUSIONES	21
VI. RECOMENDACIONES	22
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ANEXOS	29

I. INTRODUCCIÓN

La coexistencia de las plantas y el hombre, desde su aparición en la tierra le ha permitido por ensayo y error su uso para tratar sus dolencias estableciendo una relación empírica entre enfermedad y planta en el transcurso del tiempo, siendo la historia quien lo afirme^{1, 2, 3}. Aproximadamente hace 5000 años se halló una de las reliquias más antiguas, la arcilla sumeria en Nagpur, una de las más antiguas evidencias del uso tradicional de plantas medicinales¹; en el siglo XVI a.c. se escribió el "Eber Papyrus" que contiene alrededor de 7000 fórmulas magistrales y remedios⁴ e incluso los entes como Hipócrates y su discípulo Aristóteles hacían uso de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades¹. Además la naturaleza nos enseña la utilidad de esta materia vegetal; por ejemplo los primates; monos, gorilas y chimpancés, al igual que el hombre seleccionan sus plantas para curar sus padecimientos⁵.

En la actualidad en grandes sectores de la población peruana y específicamente en las zonas rurales del Perú, se viene utilizando como tradición heredable a través de cuantiosas generaciones a las plantas medicinales; debido a que sus hojas, flores, semillas, cortezas, raíces, frutos o cualquier otro órgano de la planta posee propiedades terapéuticas sustentadas empíricamente y que son aprovechadas por los pobladores haciendo uso de la materia vegetal en forma de infusiones, decoctos, baños, emplastos, frotaciones y otros^{6,7}.

Piper aduncum L comúnmente llamada "matico", pertenece a la orden Piperales, la familia Piperaceae del género Piper, distribuida por todo el mundo. De origen tropical y subtropical, es un arbusto de 1 a 4 m de alto, perenne de follaje aromático; hojas lanceoladas a subelípticas; inflorescencia en espiga simple; flores hermafroditas; fruto trígono y glabros de semillas negras^{8,9}. Es usado tradicionalmente sanar dolencias urológicas, afecciones dermatológicas, gastrointestinales, tracto respiratorio^{9,10}.

El uso de la medicina tradicional ha ido creciendo cada vez más en especial en los países en vías en desarrollo, y si hablamos de américa latina casi la mitad de su población hace uso de ella; debido

a su acceso factible frente a los servicios modernos de salud y sus elevados costos siendo las plantas de preferencia para la atención primaria^{11, 12}. A medida que ha ido incrementando su uso también se han reportado casos de pacientes intoxicados^{13,14}. En Estados Unidos según el informe anual 35 de la Asociación Americana de Centros de Control de Venenos, el consumo de herbales es la causa del 2% de todas las intoxicaciones en su país¹⁵.

La intoxicación por el uso de una planta se difiere por distintos factores como la proporción y tiempo de consumo, respuesta del sistema humano, diversidad genética y sobre todo las sustancias bioactivas que contiene, por ejemplo las saponinas una de sus actividades es la interrupción de las membranas biológicas y generación de radicales libres, y así sucesivamente^{16,17}. Por esto, se deben tomar precauciones a la hora de su uso, ya en distintos países se realizan estudios toxicológicos para seguir investigando su seguridad de uso en las diferentes poblaciones.

En 1927, Traven propone la prueba concentración Letal 50 (LC50%) para determinar la dosis de una sustancia que causa la muerte del 50% de espécimen experimental en un tiempo dado. Se ha convertido en una prueba de estandarización biológica que se debe evaluar primero a toda clase de producto químico, medicamentos, pesticidas, cosméticos, conservantes, plantas entre otros^{18,19}. El grado de toxicidad se define en función del rango en que se encuentra los valores de Concentración Letal 50 (CL50) de acuerdo con las categorías según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), extremadamente tóxico (1 – 10 ug/ml), altamente tóxico (10 – 100 ug/ml), moderadamente tóxico (100 – 500 ug/ml), ligeramente tóxico (500 – 1000 ug/ml), prácticamente no tóxico (1000 – 1500 ug/ml), y relativamente inocuo (> 1500 ug/ml). Una de las maneras de realizar este ensayo es mediante la utilización de nauplios de *Artemia Salina*²⁰.

El método de prueba de letalidad del camarón en salmuera es ideal para determinar la LC50 mediante la exposición de las larvas con la sustancia a evaluar, calculando su muerte o no después

de 24 horas, también debido a ser un método simple y de costo accesible^{18, 21}. El uso de *Artemia salina L.* es un método alternativo que puede reemplazar el uso de animales vertebrados en un nivel superior, que evita los inconvenientes durante la práctica experimental y los principios éticos. Aplicando el principio de las 3R: los métodos alternativos pueden reemplazar el uso de animales vertebrados (reemplazo), evita el uso mayor de animales en las pruebas (reducir), mejorar la calidad de vida de los animales de laboratorio (refinado)^{21, 22}.

El objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad del extracto acuoso obtenida de las hojas de *Piper aduncum L.* (matico) procedentes del Distrito de Cachicadán,

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Materiales

2.1.1. Material biológico

- La especie de *Piper aduncum L.* fue recolectada en el distrito de Cachicadán (2884 m s. n. m.), provincia de Santiago de Chuco, región La Libertad, durante el mes de septiembre de 2018.
- Huevos de *Artemia salina L.* provenientes del Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

2.1.2. Materiales y equipos de laboratorio:

- Materiales de uso común en laboratorio:
 - Vasos de precipitación 100; 250; 1000 mL
 - Tubos de ensayo 150 x 15 mm
 - Pipetas 1; 5; 10 mL
 - Micropipeta de 200 ul
 - Varillas de vidrio
 - Matraz Erlenmeyer 500 ml
 - Pizetas
- Equipos:
 - Balanza Analítica OHAUS GA 200 (precisión 0.0001 g)
 - Baño María Precistern S- 140
 - Tamiz Resh
 - Equipo Soxhlet
 - Estereoscopio Karl ZeissStemi DV4.
 - Estufa THELCO H. W. Kessel Model 17.
 - Lámpara de 40W
 - Rotavapor

2.1.3. Reactivos y Solventes

- **Solventes:**
 - Agua destilada
 - Etanol 96°GL
 - Solución salina para preparar agua de mar
- **Reactivo**
 - Dicromato de potasio

2.1.4. Ambiente:

- Laboratorio de Métodos Instrumentales de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.2 Método

2.2.1. Recolección del material vegetal

Para la recolección de la muestra de matico se realizó por el método convencional, seleccionando el material en el campo y verificando que esté en buenas condiciones.

2.2.2. Preparación de la muestra

Las hojas de *Piper aduncum L.* fueron seleccionadas, lavadas y desecadas en la estufa a 40 °C durante 2 días, luego fueron pulverizadas en un mortero y tamizadas por un tamiz de malla n.º 18. El peso total de la muestra fue de 100g.

2.2.3. Obtención del extracto acuoso de *Piper aduncum L.*:

10 g del polvo de hoja de *Piper aduncum L.* se extrajo sus principios activos con 250 mL de alcohol etílico de 96° GL, a través del método Soxhlet, durante 3 horas, el extracto etanólico obtenido se llevó a rotavapor hasta evaporarse todo el disolvente.

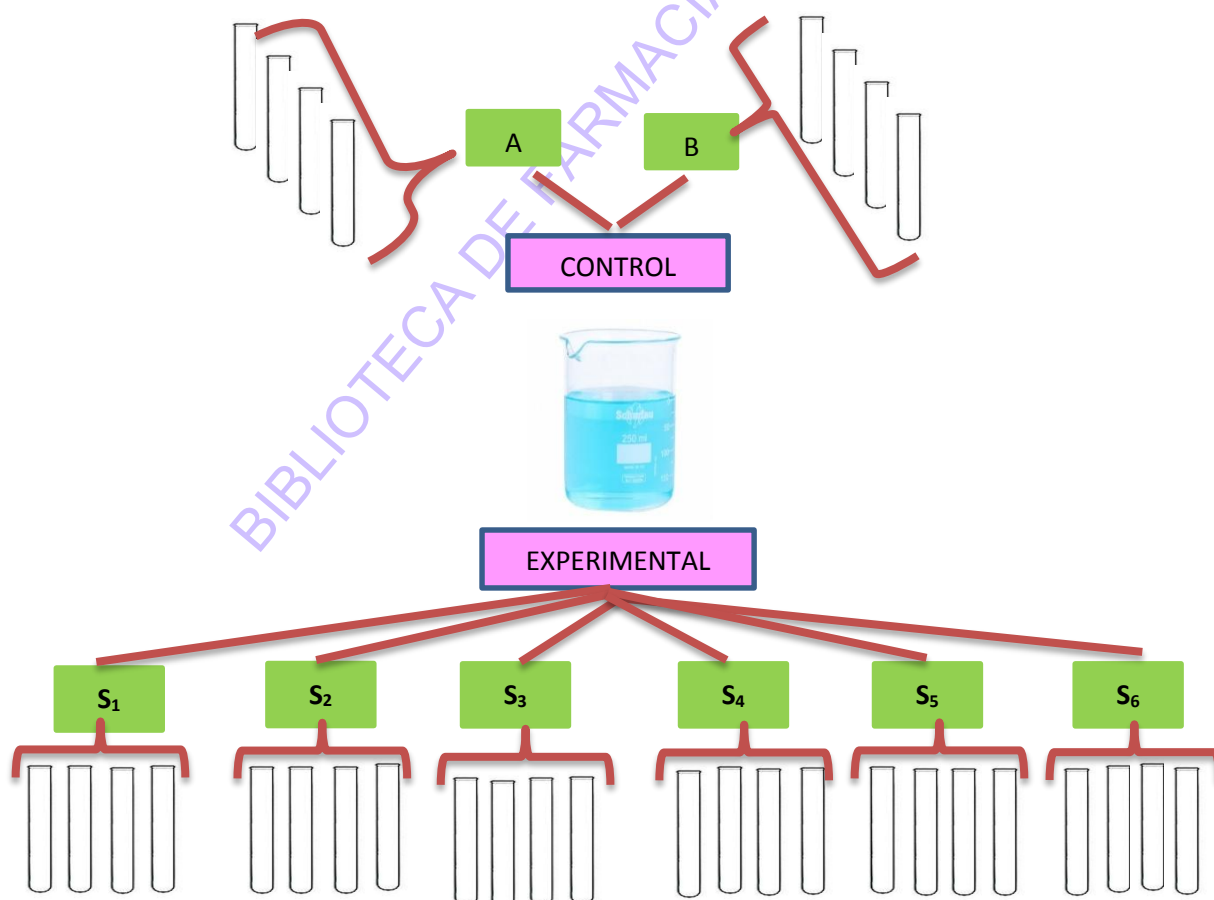
Se resuspendió 100 g del extracto seco con 2 mL de agua de mar preparada para su posterior análisis.

2.2.4. Obtención y eclosión de las larvas de *Artemia salina*

Se preparó el medio salino para los huevos de Artemia, pesando 17,5 g de sal para 400 mL de agua destilada en un matraz. Después se colocó los 0,1 g de Artemia salina para su humectación por una hora; se cubrió la parte superior del matraz con papel de aluminio. Transcurrido el tiempo, se adaptó el motor de pecera para su aireación y se colocó 1 lámpara de 40W a menos de 5 cm de cada lado del matraz para la iluminación uniforme. Se dejó por 48 horas para su eclosión.

2.2.5. Ensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina*:

Se preparó los sets de tubos para: Grupo control negativo, positivo y experimental de acuerdo al Método CDCMOC1312 Universidad de San Francisco. (ANEXO 2)



Leyenda:

A= Sub grupo control negativo.

B = Sub grupo control positivo.

S₁= Sub grupo Exp. 1

S₂= Sub grupo Exp. 2

S₃= Sub grupo Exp. 3

S₄= Sub grupo Exp. 4

S₅= Sub grupo Exp. 5

S₆= Sub grupo Exp. 6

GRUPO CONTROL:

El grupo control estuvo conformado por 2 series de 4 tubos de ensayo cada una, una serie perteneciente al control negativo y otra al control positivo. El control negativo contuvo 2 ml de agua de mar preparada con 20 nauplios para cada tubo, mientras que el control positivo contuvo 2 ml dicromato de potasio [$K_2Cr_2O_7$ 4000 ppm] para las dos primeras y para las dos últimas se preparó una solución de 400 ppm (1 mL $K_2Cr_2O_7$ 4000 ppm con 9mL de agua de mar preparada) se colocó 2 mL de dicha solución y luego se agregó 20 nauplios para cada uno.

GRUPO EXPERIMENTAL:

Los grupos Experimentales estuvieron conformados por 24 tubos de ensayo organizados en 6 series de 4 tubos cada una. Cada serie contuvo para cada tubo de ensayo con solución preparada de agua de mar ($S_1=10.8$ mL y $S_2 - S_6 =9$ mL), luego se colocó 1,2 mL de la dilución del extracto acuoso de *Piper aduncum L.* (matico) y las siguientes respectivas diluciones de 1:20, 1:40, 1:160, 1:640 y 1:2560. Finalmente se colocó 2 mL de dicha solución y luego se agregó 20 nauplios para cada tubo.

En ambos grupos se les colocó 1 lámpara de 40W a menos de 5 cm de cada lado para la iluminación uniforme. Se dejó por 24 horas para su eclosión.

2.2.6. Conteo de nauplios

Transcurrido las 24 horas de exposición de los nauplios con el extracto acuoso, se pasó a contabilizar los nauplios vivos, moribundos y muertos, los moribundos se les considero como vivos.

2.2.7. Análisis de datos

La CL_{50} fue determinada por la gráfica de porcentaje de supervivencia con la concentración del extracto acuoso y la prueba de una ecuación lineal para el área de la curva con el mayor cambio, este valor es presentado como promedio con su desviación estándar de las 4 repeticiones para cada dilución del extracto acuoso.

$$CL_{50} = \frac{50-b}{m}$$

Dónde:

CL₅₀: Concentración letal media, concentración necesaria para matar al 50% de los nauplios.

m: Pendiente de la recta.

b: Intercepto de la recta.

50: Concentración media.

Los valores de CL_{50} por debajo de 100 $\mu\text{g/mL}$ fueron considerados como altamente tóxicos, 100–499 $\mu\text{g/mL}$ como moderadamente tóxicos y 500–1000 $\mu\text{g/mL}$ como ligeramente tóxicos, los valores sobre 1000 $\mu\text{g/mL}$ fueron considerados como no tóxicos.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Número de nauplios de *Artemia salina* que sobrevivieron después de tratar con el extracto acuoso de *Piper aduncum L.* y el porcentaje de mortalidad.

Concentración (ug/ml)	Número Total de Nauplios	Numero de nauplios sobrevivientes despues de 24 horas				Total de números supervivientes	% de mortalidad
		T1	T2	T3	T4		
5000	80	0	0	0	0	0	100
1250	81	20	20	20	20	80	1.2
312.5	80	20	20	19	21	80	0
78.1	79	19	21	19	20	79	0
19.5	78	19	20	20	19	78	0
4.88	78	19	19	19	21	78	0

Fuente: Datos tomados del Laboratorio Métodos Instrumentales de la facultad de Ingeniería Química

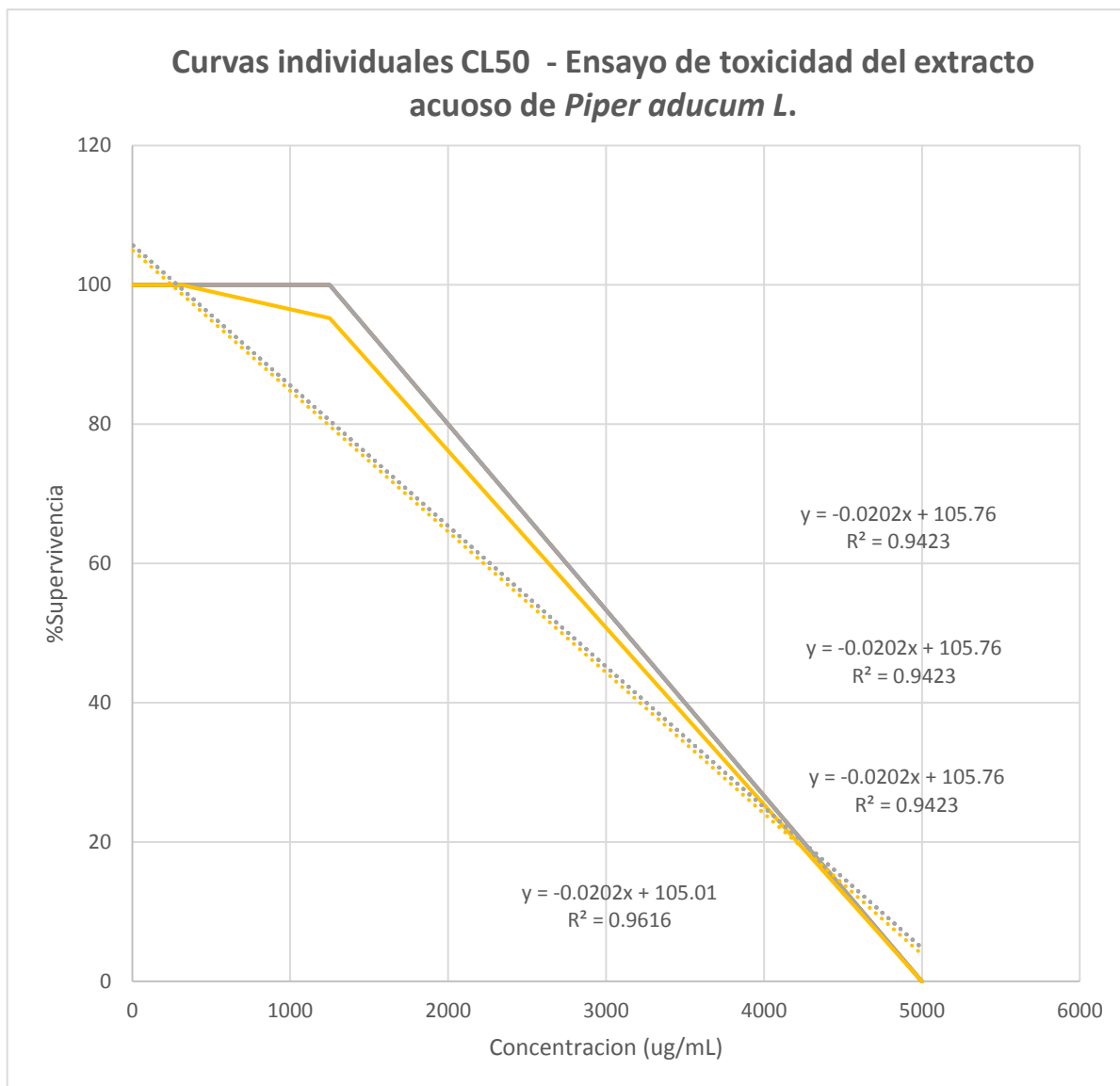


Figura 1. Curvas individuales de concentración letal media (CL₅₀) del ensayo de toxicidad del extracto acuoso de hojas de *Piper aduncum* L. “matico” recolectadas en el Distrito de Cachicadán, Provincia de Santiago de Chuco – Región La Libertad.

Tabla 2. Promedio de la CL50 del extracto acuoso de *Piper aduncum L.* (ug/ml) utilizando *Artemia salina* como sujeto de prueba de los grupos experimentales luego de 24 horas de exposición de nauplios al extracto.

TUBOS	CL50
T1	2760.40
T2	2760.40
T3	2760.40
T4	2723.27
PROMEDIO	2751.11

Concentración letal 50 (LC₅₀) = **2751.11 µg / ml (no toxico)**

IV. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales están recibiendo una atención en aumento, debido a su uso por la población en los países en desarrollo ²³. Perú es uno de ellos, debido a que las condiciones de pobreza de la población, disminuyen el acceso a los servicios de salud, por lo que se ven obligados a buscar otras opciones como es el uso de las plantas medicinales. Cachicadán alberga una variedad de plantas e hierbas medicinales ²⁴, siendo una de ellas *Piper aduncum* “matico” muy utilizada por los pobladores que habitan en esa provincia para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio cuando llegan las temperaturas a descender, invierno. Debido al consumo de esta planta de manera empírica se realizó el estudio de toxicidad para contribuir con la seguridad de su uso al ser consumidas por los pobladores de este distrito.

Dentro de los ensayos de toxicidad encontramos el de letalidad sobre *A. salina*, que ha sido utilizado en diferentes investigaciones de toxicidad aguda como plantas, compuestos químicos con acción farmacológica, metales, etc. Este tipo de ensayo mostró resultados similares al ser comparado con estudios de toxicidad en ratones ²⁵.

En la tabla 1, se determinó el número de nauplios sobrevivientes después de 24 horas en las seis concentraciones trabajadas y cada una de ellas con 4 repeticiones, observándose que en la concentración de 5000 ug/mL causa la muerte de todos los nauplios pero en las restantes su porcentaje de mortalidad es casi nula.

En la figura 1, se realizó las curvas individuales de concentración letal media (CL50) del ensayo de toxicidad del extracto acuoso de hojas de *Piper aduncum L.* “matico” de cada repetición por las concentraciones empleadas, permitiendo por medio de la ecuación de la recta de cada curva poder obtener matemáticamente el CL50.

Se observó que el grado de letalidad mostrado por el extracto acuoso es directamente proporcional a la concentración del extracto acuoso que va desde la concentración más baja (4.88 µg / ml) a la concentración más alta (5000 ug/mL). En la concentración más elevada se observa una muerte

absoluta de los nauplios, este porcentaje de mortalidad producido por *Piper aduncum L.* indica la posible presencia de principios citotóxicos en este extracto acuoso.

Arroyo J, 2011, en su “Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum L.* “matico” determinó presencia de: saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides (mayor ausencia en el extracto etanólico que el acuoso) y encontró esteroides y quinonas solo en el extracto etanólico.

Los alcaloides y esteroides presentan actividad citotóxica ^{27,28}. Por lo tanto, la muerte de los nauplios en la concentración de 5000 ug/mL observada puede deberse a la presencia de dichos compuestos, pero se necesita una dosis muy elevada para producir su mortalidad.

En la tabla 2, se obtuvo el CL50 del extracto acuoso de *Piper aduncum L.* (ug/ml) utilizando *Artemia salina* como sujeto de prueba de los grupos experimentales luego de 24 horas de exposición de los nauplios en el extracto, siendo 2751.11 µg / ml considerándose relativamente inocuo, de acuerdo con las categorías según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), si la concentración letal 50 es mayor a 1500 ug/ml.

Bussman R, 2011, en su trabajo “Toxicidad de las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional en el norte del Perú” concluye que los métodos de preparación tradicionales tienen en cuenta diferentes niveles de toxicidad en extractos acuoso y de etanol al elegir el solvente apropiado para la preparación de un remedio. Por ejemplo los extractos acuoso no son tóxicos, mientras que los extractos etanólicos muestran una alta toxicidad en *Ocimum basilicum L.*, *Piper aduncum L.*, *Laccopetalum giganteum (Wedd.) Ulbrich*.

Los resultados encontrados en la investigación son similares a los de Bussman, concluyendo que el extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum L.* son no tóxicas pero no se descarta la posibilidad de que en solvente alcohólico podrían ser tóxicas como lo mencionado en su trabajo de investigación por Bussman.

V. CONCLUSIONES

1. Se determinó que el grado de toxicidad del extracto acuoso de las hojas *Piper aduncum L.* (matico) en larvas de *Artemia salina* fue relativamente inocuo o no tóxico.
2. Se determinó que la concentración letal 50 (CL50) del extracto acuoso de las hojas de *Piper aduncum L.* fue 2751.11 ug/ml, lo cual no generó efectos tóxicos en larvas *Artemia salina*.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VI. RECOMENDACIONES

- Cuando se realice la agitación para homogenizar el medio salino con los huevos de *Artemia salina* se debe realizar con mucho cuidado para evitar que estas no queden pegadas en las paredes del matraz, evitando así su eclosión en el tiempo requerido.
- Al momento de contabilizar las larvas de *Artemia salina* debe realizarse con mucho cuidado debido a que son muy pequeñas y frágiles, evitando así su muerte.

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jamshidi F, Lorigooini Z, Amini H. Medicinal plants: Past history and future. *Journal of HerbMed Pharmacology*. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 7(1): 1-7.
Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/322399333_Medicinal_plants_Past_history_and_future_perspective
2. Valle E, Meza D, Tabora J, Elvir M, Muñoz D, Hugo J, Castellanos H, Hernández J, Sánchez J, Mejía I, Herrera E. Aportes al inventario y caracterización de las plantas medicinales del pueblo originario Lenca de Intibucá, Honduras. *Revista del Laboratorio de Etnología María Eugenia Bozzoli Vargas*. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 28(1): 1-19. Disponible en:
http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/08/910902/aportes-al-inventario-y-caracterizacion-de-las-plantas-medicina_7e1FJ0d.pdf
3. Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. España: Editorial OmniaScience. 2016. Pp: 351-410.
4. Sonam D, Padma G, Tsewang D, Tsering A, Tashi S, Thinles T. Status of Medicinal and Aromatic Plants in the State of Jammu and Kashmir, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 7 (12): 2597-2615. Disponible en: <https://www.ijcmas.com/7-12-2018/Sonam%20Dawa,%20et%20al.pdf>
5. Halberstein R. Medicinal Plants : Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Annals of Epidemiology*. [Internet]. 2005. [Citada 07 de abril del 2019]; 15(9):686-99. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15921929>
6. Rodríguez D. Cadena Alimentaria 7: Plantas Medicinales. [en línea]. Editorial ITDG América Latina. 2002. Disponible en:

http://books.google.com.br/books?id=RaF47u8BSy8C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

7. Mostacero J. Plantas medicinales del Perú. Perú: Editorial Asamblea Nacional de Rectores. 2011. Pp: 1-2.
8. Hurtado R. El género Piper L. (piperaceae) en el santuario ecológico Municipal San Juan de Corralito, Santa Cruz, Bolivia. *Kempffiana*. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 14(1):32-38. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/327510420_el_genero_piper_l_piperaceae_en_el_santuario_ecologico_municipal_san_juan_de_corralito_santa_cruz_bolivia
9. Naturalista. Piper aduncum L. [en línea]. México. 2019. Disponible en:
https://www.naturalista.mx/taxa/166894-Piper-aduncum#Nombre_com%C3%BAn
10. Wang Y, Morris S, Yang J, Niu H, Long C, Lee K. Anticancer Principles from Medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) Plants. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. [Internet]. 2014. [Citada 07 de abril del 2019]; 4(1): 8–16. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4032846/>
11. Bussmann R, Sharon D. Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonia. *La Flora Mágica y Medicinal del Norte del Perú*. *Ethnobotany Research & Applications*. [Internet]. 2016. [Citada 07 de abril del 2019]; 15(1): 1–293. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Rainer_Bussmann/publication/329029046_Plantas_medicinales_de_los_Andes_y_la_Amazonia/links/5bf1b05792851c6b27c87d2e/Plantas-medicinales-de-los-Andes-y-la-Amazonia.pdf
12. Gallegos M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *SciELO*. [Internet]. 2016. [Citada 07 de abril del 2019]; 77(4). Disponible en:
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002

13. Mensah M, Komlaga G, Forkuo A, Firempong C, Anning A, Dickson R. Toxicidad e implicaciones de seguridad de los medicamentos herbarios utilizados en África. Ghana: Editorial Philip F. Builders. 2017.
14. Sheibani M, Nayernouri T, Dehpour A. Herbal Medicines and Other Traditional Remedies in Iran – A Tragedy Unfolds. Archives of Iran Medicine. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 21(7):312-314. Disponible en: file:///C:/Users/DELL/Downloads/aim-21-312.pdf
15. Gummin D, Mowry J, Spyker D, Brooks D, Osterthaler K, Banner W. 2017 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 35th Annual Report. Clinical Toxicology. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 1-203. Disponible en: <https://piper.filecamp.com/uniq/cwK5Ko3PLwXzfBkk.pdf>
16. Boukandou M, Mewono L, Aboughe S. Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. Journal of Ethnopharmacology. [Internet]. 2015. [Citada 07 de abril del 2019]; 174: 618–627. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/278790356_Toxicity_Studies_of_medicinal_Plants_used_in_sub-Saharan_Africa
17. Lakmichi H, Bakhtaoui F, Gadhi C, Ezoubeiri A, El Jahiri Y, El Mansouri A, Zrara I, Loutfi K. Toxicity Profile of the Aqueous Ethanol Root Extract of *Corrigiola telephiifolia* Pourr. (Caryophyllaceae) in Rodents. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. [Internet]. 2011. [Citada 07 de abril del 2019]; 1–10. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/317090/>
18. Simanjuntak L. Lethality concentration 50 (LC50) assay of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) boerl extract in fibroblast cell culture. II Nommensen International Conference on Technology and Engineering. 2018. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 420: 012144. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/420/1/012144/pdf>

19. Erhirhie E, Ihekwereme C, Ilodigwe E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 11(1): 5–12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117820/>
20. Sánchez L, Neira A. Bioensayo General de Letalidad en *Artemia Salina*, a Las Fracciones del Extracto Etanólico De *Psidium Guajava*. L y *Psidium Guineense*. Sw. *International Information System for the Agricultural Science and Technology (AGRIS)*. [Internet]. 2005. [Citada 07 de abril del 2019]; Pp: 40-45. Disponible en: https://www.jdc.edu.co/revistas/index.php/Cult_cient/article/view/469/495
21. Lestari M, Soemardji A, Fidrianny I, Yusuf A. The capability of brine shrimp test as a teratogenicity screening system. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. [Internet]. 2017. [Citada 07 de abril del 2019]; 10(3): 454. Disponible en: <https://sci-hub.tw/10.22159/ajpcr.2017.v10i3.16511>
22. Doke S, Dhawale S. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, [Internet]. 2015. [Citada 07 de abril del 2019]; 23(3): 223–229. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4475840/>
23. Flores D. Plantas medicinales y su empleo en el campo de la obstetricia. *Revista Internacional de Salud Materno Fetal*. [Internet]. 2018. [Citada 07 de abril del 2019]; 3 (2): 1 -2. Disponible en: <http://ojs.revistamaternofetal.com/index.php/RISMF/article/view/68/75>
24. Bautista W. Aplicación del programa de City Marketing – Nuvo Cachicadan – para lograr el posicionamiento del Distrito de Cachicadan como atractivo turístico en el Distrito de Trujillo 2015. [Tesis de Pregrado]. Universidad Nacional de Trujillo. [Internet]. 2016. [Citada 07 de abril del 2019]. Disponible en: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3218/bautistagarcia_walter.pdf?sequence=1

25. Lozano L, García C, Alvaríño L, Iannacone J. Acute toxicity of three mouthwashes based on *Plantago major*, *Uncaria tomentosa* and *Eucalyptus globulus* on brine shrimp *Artemia franciscana*. *The Biologist*. [Internet]. 2017. [Citada 07 de abril del 2019]; 15(2): 437-448. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/322235630_acute_toxicity_of_three_mouthwashes_based_on_plantago_major_uncaria_tomentosa_and_eucalyptus_globulus_on_brine_shrimp_artemia_franciscana
26. Arroyo J. Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* L. “matico”. [Internet]. 2011. [Citada 07 de abril del 2019]. Disponible en:
<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4599>
27. Phi T, Pham V, Thi Mai H, Litaudon M, Guéritte F, Nguyen V, Chau, V. Cytotoxic Steroidal Alkaloids from *Kibatalia laurifolia*. *Journal of Natural Products*. [Internet]. 2011. [Citada 07 de abril del 2019]; 74(5):1236–1240. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/50890305_Cytotoxic_Steroidal_Alkaloids_from_Kibatalia_laurifolia
28. Zaki A, Seheli B, Minhazur K, Mofazzol H, Suriya S, Satyajit R. Phytochemical screening, antioxidant and cytotoxic activity of fruit extracts of *Calamus tenuis* Roxb. *Journal of Coastal Life Medicine*. [Internet]. 2014. [Citada 07 de abril del 2019]; 2(8): 645-650. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/307746118_Phytochemical_screening_antioxidant_and_cytotoxic_activity_of_fruit_extract_of_Calamus_tenuis_Roxb
29. Bussmann R, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris B, Dubosec D, Ruizc D, Saledac J, Martinezc M, Carillo L, Walker K, Kuhlman A, Townesmith A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, [Internet]. 2011. [Citada 07 de abril del 2019]; 137(1): 121–140. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/51130049_Toxicity_of_medicinal_plants_used_in_Northern_Peru

BIBLIOTECA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

ANEXOS 1

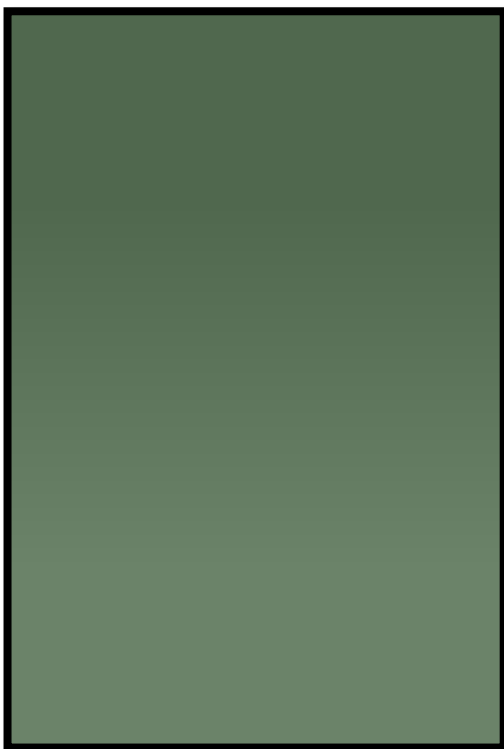
1. Recolección y selección de la materia prima



Las muestras fueron recolectadas en el mes de setiembre del 2018.

Se eliminó las hojas secas, marchitas, que estuvieron cubiertas por hongos, además de

2. Lavado y secado de las muestras

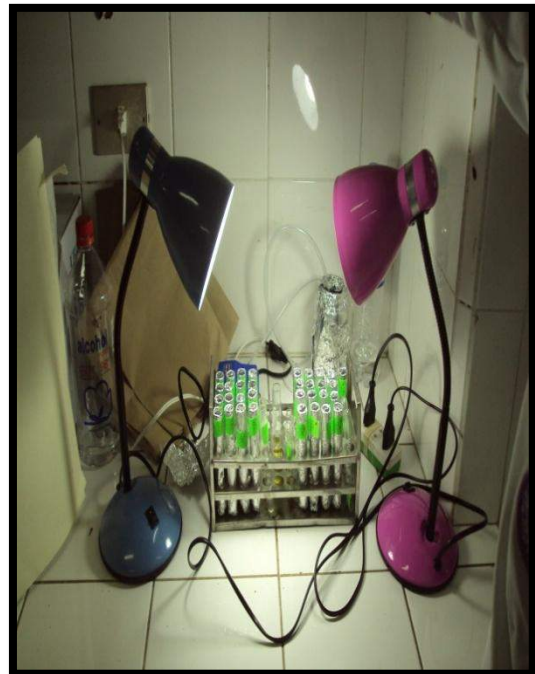


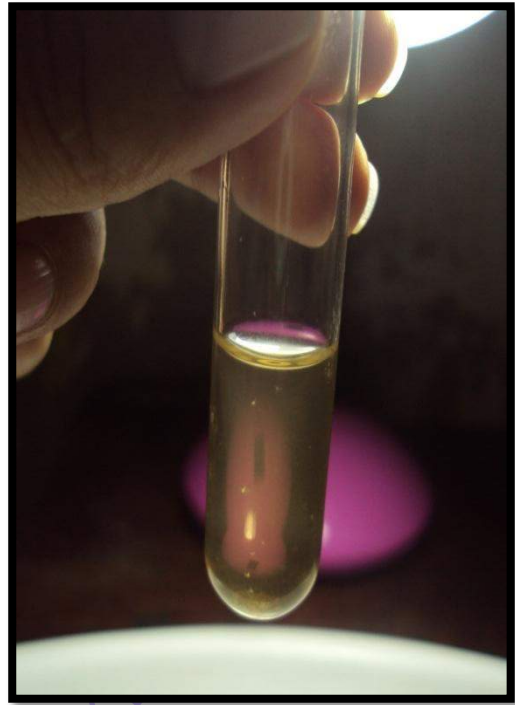
Se procedió a lavar el material vegetal con agua potable a chorro y después con agua destilada. Luego se dejó ambas muestras bajo la sombra por espacio de 24 horas, en seguida se continuó con el secado en estufa a una temperatura menor a 40° durante 24 horas.

3. Preparación de medio salmuera para los huevos de *Artemia salina*



4. Ensayo de letalidad en larvas de *Artemia salina* y Conteo del nauplios:





BIBLIOTECA DE FARMACIA Y

ANEXO 2**Toxicology Assay Protocol****CDC M061312****Protocol for Brine Shrimp Assay****I. INTRODUCCION**

It will be carried out in two phases: two wide range experiments for observational and quantitative.

I. METHOD**2.1 Brine Shrimp Media:**

Preparation instant solution of 35% sea salt, dissolving 35g of sea salt in 1L of distilled water.

1.2 Hatching the Brine Shrimp:

Label a 500mL Erlenmeyer flask, first place 30 mL of the sea salt solution (SSS) with 1 g of shrimp egg for hydration, then 370 mL remaining. Cover the upper part with aluminum, place a 40w lamp every 5cm of the flask and leave it for 26 hours for its exclosion.

1.3 Experimental Procedure:

Label 32 tubes, comprising 4 rows (A, B, C, D) and each will contain 8 tubes. Tubes 8 will be the negative control group, will only have 2 mL SSM while tubes 7 will be the positive control group, 2 ml of a 400 ppm $K_2Cr_2O_7$ solution (9 ml of SSM + 1mL $K_2Cr_2O_7$ 4000ppm). In tubes 1 add 1.2mL of purified extract with 10.8mL SSM and shake, remove 3mL of tube 1 to tube 2 containing 9 mL SSM, repeat this last procedure in tubes 3-6. In each tube, between 15 and 20 shrimp will be placed, each of them will be covered with aluminum foil and illuminated with the 40w lamps for 24 hours.

NOTE: Lean with the tip of a pipette to transfer the shrimp.

1.4 COUNTING SHRIMP: Shrimp are read after 24 hours of incubation with extract.

Evaluation of Experiment for Screening Series: Determine the concentrations by eye in which all the shrimp are dead. Identify the S series tubes where you go from all dead to all alive. Follow the appropriate dilution for the E series experiment where E1=S1 if the break occurs between S1 and S2, etc.

Counting Shrimp for Quantitative Expansion Experiment

Record the start and end time of counting.

Transfer the contents to a 12-well tissue culture plate for visualization under a dissection microscope. The dying shrimp will be considered alive; this will be repeated for all tubes.

1.5 EXPANSION EXPERIMENTS DILUTIONS:

Each expansion of the screening test will cover the range between the concentrations at which most shrimp remained alive and most died. Therefore E1 corresponds to the concentration at the top of the range and will be serially diluted 4:3 down through E6 to the bottom of the range. See chart below for E1 preparations. (IO = Instant Ocean solution; ext = concentrated extract)

E1 =	Dilution Factor	Volumes
S1	1:20	1.8mL ext + 34.2mL IO
S2	1:40	0.9mL ext + 35.1mL IO
S3	1:160	(A) 0.5mL ext + 3.5mL IO (B) 2mL (A) + 38mL IO
S4	1:640	(A) 0.5mL ext + 3.5mL IO (B) 2mL (A) + 38mL IO (C) 9mL (B) + 27mL IO
S5	1:2560	(A) 0.5mL ext + 3.5mL IO (B) 2mL (A) + 38mL IO (C) 2mL (B) + 30mL IO

- 1) Pipette 9mL of IO into tubes E2-E6.
- 2) Vortex E1 and pipette 27mL of E1 into E2.
- 3) Repeat this 4:3 dilutions through tube E6, ensuring to vortex each tube after diluting, and discarding 27mL of E6 after dilution.
- 4) Follow steps 9-14 of Experimental Procedure after labeling tubes A1-A8, B1-B8, C1-C8, and D1-D8.