

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIDAD DE POSGRADO**

**Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de  
hojas de *Jungia paniculata* (dc.) A. Gray “matico  
serrano” en un modelo de daño gástrico en ratas  
inducido por etanol 70%**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Elsa Béjar Camarena

**ASESOR**

Silvia Suárez Cunza

Lima – Perú

2016

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi señor padre Don Eduardo Béjar Terán

A mi tía Justina Béjar Terán

A Eduardo, Alicia y Mariano

A mis sobrinos Juan Roger, Fiorella, Luis Eduardo y

Jhannely .

## **AGRADECIMIENTO**

Al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina San Fernando.

A mi asesora Dra. Silvia Suárez Cunza por compartir su experiencia profesional.

Al Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

Al Instituto de Patología de la UNMSM

Al Magister Oscar Huamán Gutiérrez.

A todos los profesionales y amigos que me apoyaron en cada etapa del desarrollo de la tesis.

## INDICE GENERAL

1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1 Situación Problemática .....	01
1.2 Formulación del Problema .....	03
1.3 Justificación teórica.....	03
1.4 Justificación práctica.....	03
1.5 Objetivos .....	03
1.5.1 Objetivo general.....	03
1.5.2 Objetivos específicos .....	03
2. CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes de investigación .....	05
2.2 Bases Teóricas .....	06
2.2.1 Taxonomía de <i>Jungia paniculata</i> .....	07
2.2.2 Uso etnofarmacológico de <i>Jungia paniculata</i> .....	08
2.2.3 Anatomía del estómago de rata.....	09
2.2.4 Fisiopatología del daño en la mucosa gástrica aguda:	
Inducción aguda por etanol .....	09
2.2.5 Mecanismo defensivo de la mucosa gastroduodenal .....	10
2.2.6 Radicales libres .....	12
2.2.7 Antioxidantes .....	14
2.2.7.1 Antioxidantes enzimáticos.....	14
2.2.7.2 Antioxidantes no enzimáticos: endógenos y	
exógenos .....	16
2.2.8 Estrés oxidativo .....	18
2.2.8.1 Estrés oxidativo en la mucosa gástrica inducido	
por etanol .....	19
3. CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	
3.1. Tipo de investigación .....	22
3.2. Materiales .....	22
3.2.1. Material biológico.....	22
3.2.2 Materiales de laboratorio .....	22
3.2.3 Equipos e Instrumentos .....	22

3.2.4	Reactivos.....	23
3.3	Variables.....	23
3.4	Método experimental.....	24
3.4.1	Recolección y preparación de la muestra vegetal .....	24
3.4.2	Clasificación de la muestra .....	24
3.4.3	Obtención del extracto hidroalcohólico .....	24
3.4.4	Marcha fitoquímica: Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios.....	25
3.4.5	Determinación de la actividad antirradical libre (Capacidad antioxidante Total) del extracto hidro- alcohòlico de <i>Jungia</i> <i>paniculata</i> .....	26
3.4.6	Modelo experimental de Inducción de la lesión gástrica .....	29
3.4.7	Evaluación de las lesiones gástricas agudas .....	30
3.4.8	Preparación del homogenizado de tejido gástrico .....	31
3.4.9	Determinación de los indicadores bioquímicos en homogenizado de estómago .....	31
3.4.9.1	Indicadores bioquímicos antioxidantes con actividad enzimática. ....	31
3.4.9.1.1	Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD) .....	31
3.4.9.1.2	Actividad de la Catalasa .....	33
3.4.9.2	Indicadores bioquímicos de estrés oxidativo .....	33
3.4.9.2.1	Determinación de GSH reducido .....	33
3.4.9.2.2	Determinación de GSH total .....	35
3.4.9.2.3	Especies reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	36
3.4.9.3	Determinación de proteínas .....	38
3.4.10	Ensayo de toxicidad aguda.....	38
3.4.11	Análisis estadístico .....	39
4.	<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1	Presentación de resultados.....	40
4.1.1.	Marcha fitoquímica .....	40
4.1.2	Actividad antirradical libre .....	40
4.1.3	Evaluación macroscópica de la mucosa gástrica .....	42

4.1.4	Indicadores bioquímicos antioxidantes con actividad enzimática .....	42
4.1.4.1	Actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD) .....	42
4.1.4.2	Actividad específica de la catalasa (CAT) .....	43
4.1.5	Indicadores bioquímicos de estrés oxidativo .....	43
4.1.5.1	Niveles de Glutation reducido y total .....	43
4.1.5.2	Niveles de especies reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	44
4.1.6	Toxicidad aguda .....	44
4.2	Discusión de resultados .....	45
4.2.1	De la pruebas analíticas del extracto hidroalcohólico de <i>Jungia paniculata</i> .....	45
4.2.2	De los resultados del ensayo experimental .....	47
5.	CONCLUSIONES .....	53
6.	RECOMENDACIONES .....	53
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
8.	ANEXOS	
8.1	Certificación Botánica .....	63
8.2	Curva de calibración de la Vitamina C .....	64
8.3	Curva de calibración del Trolox.....	65

## LISTA DE FIGURAS

1. *Figura 1.- Jungia paniculata. Fuente.* Tomado del Real Jard. Bot. Madrid. .... Pág. 8
2. *Figura 2.-* Diagrama esquemático de los tres niveles de defensa del estómago. *Fuente.* Tomado de Atuma 2000. .... Pág. 12
3. *Figura 3.-* Generación de especies reactivas de oxígenos (ROS): Reducción del oxígeno molecular. *Fuente.* Tomado de Martínez 2005. Pág. 11. [http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema02\\_morfologia/02\\_5radicales.htm](http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo2/tema02_morfologia/02_5radicales.htm). .... Pág. 13
4. *Figura 4.-* Producción de radicales superóxido por la cadena de transporte de electrones mitocondrial. *Fuente.* Tomado de: /TESIS/enzimas%20antioxidantes%20figura.html ..... Pág. 16
5. *Figura 5.-* Rutas del metabolismo del alcohol. *Fuente.* Tomado de Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. Int. J. Environ. Res. Public Health 2010. .... Pág. 19
6. *Figura 6.-* Esquema modificado del daño oxidativo por etanol. Fuente. Tomado de Bhattacharya et al, 2014. .... Pág. 21
7. *Figura 7.-* Reducción del DPPH. *Fuente.* Tomado de DPPH-test: Determination of scavenger properties - Baltic analytics... Pág. 27
8. *Figura 8.-* Identificación del glutation. *Fuente.* Tomado de Principle of Total Glutathione Quantification Kit..... Pág. 34
9. *Figura 9.-* Formación del complejo malondialdehído. *Fuente.* Tomado de Analytical Methods for Resolving Data de TBA<sub>2</sub>-MDA..... Pág. 36
10. *Figura 10.-* Curva de reducción del DPPH por el extracto etanólico de hojas de *Jungia paniculata* ..... Pág. 41

## LISTA DE CUADROS

1. *Cuadro 1.-* Determinación del IC<sub>50</sub> de *Jungia paniculata* y estándares..... Pág. 27.
2. *Cuadro 2.-* Determinación de los niveles de GSH reducido en homogenizado gástrico. .... Pág. 34
3. *Cuadro 3.-* Determinación de los niveles de GSH total en homogenizado gástrico ..... Pág. 35
4. *Cuadro 4.-* Determinación de Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). .... Pág. 37
5. *Cuadro 5.-* Determinación de proteínas en homogenizado gástrico. .... Pág. 38
6. *Cuadro 6.-* Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano”. .... Pág. 40
7. *Cuadro 7.-* Resultados de IC<sub>50</sub> y % captación de DPPH, de Vitamina C, Trolox y *Jungia paniculata*. .... Pág. 42
8. *Cuadro 8.-* Resultado de las enzimas antioxidantes SOD y Catalasa en homogenizado de estómago de ratas sometidas a injuria con etanol al 70%. .... Pág. 43
9. *Cuadro 9.-* Resultado de los indicadores de estrés oxidativo en homogenizado de estómago de ratas sometidas a injuria con etanol al 70%. .... Pág. 44

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” sobre el tejido gástrico de ratas injuriado por etanol 70%. **Metodología:** Se preparó un extracto hidroalcohólico 70% de hojas estabilizadas. La capacidad antioxidante se evaluó mediante DPPH. Se distribuyeron aleatoriamente 24 ratas *Sprague - Dowley* en 4 grupos: I (NaCl - NaCl), II (NaCl - EtOH), III (Extracto 600 mg/kg – EtOH) y IV (Extracto 600 mg/kg – NaCl), según el método de Robert et al., (1979). El estómago fue obtenido por laparotomía, se preparó un homogenizado de la parte glandular y se centrifugó a 2 000 RPM x 5', las pruebas bioquímicas se realizaron en el sobrenadante: cuantificación de GSH reducido y total, medición de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), actividad específica de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). La toxicidad aguda se evaluó a dosis límite. **Resultados:** El extracto presentó una capacidad antioxidante de IC<sub>50</sub> 4,15 µg/mL en comparación a Vitamina C 2,29 µg/mL y Trolox 3,38 µg/mL. Se observó un incremento de GSH reducido y total en el grupo IV. Los niveles de TBARS están significativamente disminuidos en III y IV. Hay recuperación significativa de La SOD en los grupos III y IV respecto al grupo II. No hay variación significativa en la actividad específica de CAT. Con respecto a la toxicidad aguda resultó ser no dañina. **Conclusiones:** El extracto hidroalcohólico tiene buena actividad antioxidante y presenta efecto gastroprotector, previniendo la lipoperoxidación e incrementando la capacidad antioxidante (GSH y SOD).

**Palabras claves:** *Jungia paniculata*, actividad gastroprotector, estrés oxidativo, antioxidante.

## SUMMARY

**Objective:** To determine the antioxidant effect of alcoholic extract of *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray "matico serrano" leaves, on gastric tissue of rats injured by 70% ethanol. **Methodology:** It was prepared a 70% alcoholic extract of stabilized leaves. The antioxidant capacity was evaluated by DPPH. They were randomized 24 male Sprague - Dawley into 4 groups: I (NaCl - NaCl), II (NaCl - EtOH), III (Extract 600 mg / kg - EtOH) and IV (Extract 600 mg / kg - NaCl), according Robert et al., method (1979). The stomach was obtained by laparotomy, a homogenate of the glandular portion was prepared and centrifuged at 2 000 RPM x 5', biochemical tests were performed in the supernatant: quantification of GSH reduced and total, measurement of reactive species thiobarbituric acid (TBARS), specific activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The acute toxicity was assessed dose limits. **Results:** The extract showed an antioxidant capacity  $IC_{50}$  4,15  $\mu$ g / mL compared to Vitamin C 2,29  $\mu$ g / mL and Trolox 3,38  $\mu$ g / mL . GSH increased and reduced total Group IV was observed. TBARS levels were significantly decreased in III and IV. No significant recovery of SOD in groups III and IV compared to group II. No significant variation in specific activity of CAT. Acute toxicity it proved to be not harmful. **Conclusions:** The alcoholic extract has good antioxidant activity and has gastroprotective effect, preventing lipid peroxidation and increase antioxidant capacity (GSH and SOD).

**Keywords:** *Jungia paniculata*, gastroprotective activity, oxidative stress, antioxidant.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Situación problemática

Las plantas medicinales son uno de los recursos importantes de los sistemas de salud tradicionales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) como ente rector en salud a nivel mundial, aboga por el uso racional de la Medicina Tradicional Complementaria (MTC) mediante el fomento de su utilización basada en pruebas científicas. (OMS, 2004). En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población mundial utiliza plantas medicinales como tratamiento paralelo a su tratamiento médico (Valdivia, 2011). En el Perú, el sistema de salud tradicional abarca entre otros componentes los recursos curativos (plantas, minerales, animales) y las terapias.

El Ministerio de Salud a través del Instituto Nacional de Salud refiere que las especies vegetales identificadas botánicamente en nuestro país son alrededor de 5 000, la mayor parte son nativas de nuestro país (unas 4 400) y unas 600 especies son introducidas, la mayoría de las especies nativas son silvestres y unas 1 922 son cultivadas. (MINSa-INS, 2014)

El Instituto Rural de Valle Grande de Cañete en el 2002 identificó en la Región del Nor-Yauyos; a través de encuestas etnobotánicas; 126 especies de plantas con uso medicinal tradicional, de las cuales 32 han sido clasificadas según su acción terapéutica principal, entre ellas se encuentra el “matico serrano” *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray.

Por la información recogida, esta especie vegetal es empleada en el tratamiento de la gastritis, como antiulcerosa, antitusígena, expectorante, en el tratamiento de heridas, golpes, amigdalitis entre otras.

Sin embargo su uso tradicional en nuestro país, hasta el momento carece de sustento científico en las diferentes formas de empleo. Estudios previos *in*

*vitro* sin embargo han mostrado capacidad de captar radicales libres como el radical hidroxilo. Béjar y Suárez, (2007).

La gastritis es una entidad nosológica de elevada morbilidad a nivel mundial, su incidencia varía en las diferentes regiones y países. En el Perú, es una de las causas que con más frecuencia motivan la consulta gastroenterológica (Valdivia, 2011).

Esta alteración a nivel de la mucosa gástrica puede presentarse de forma aguda o crónica producida por factores exógenos y endógenos. La mayor incidencia se observa en grupos poblacionales sometidos al estrés laboral, desorden en el horario de alimentación, automedicación con antiinflamatorios no esteroideos (AINES), infección por *Helicobacter pylori*, consumo de sustancias irritantes (bebidas alcohólicas, cigarro, condimentos), etc. (OMS, 2004,).

En nuestro país, los reportes epidemiológicos del MINSA, entre los años 2004 y 2014, muestran un incremento mayor al 100% en la incidencia de enfermedades del esófago, estómago y duodeno, se informa que durante el año 2004 se atendieron en consulta externa 448 168 y en el 2014 fueron 938 777 pacientes.

Estudios realizados en el 2009 por la Dirección de Salud IV Lima - Este, en sus trabajadores asistenciales con respecto a la prevalencia del estrés laboral y morbilidad laboral, se encontró que la gastritis y/o úlceras pépticas se presentó en un 30,5% superando a trastornos asmáticos (25%) y otras enfermedades como hipertensión arterial (0,6%) e infarto al miocardio (4,9%).

Hasta la actualidad en nuestro país y en la literatura científica internacional, no se han reportado investigaciones científicas *in vivo* que expliquen mecanismos bioquímicos del uso tradicional del extracto de *Jungia paniculata* en un modelo de gastritis.

## **1.2 Formulación del problema:**

¿El extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano”, tiene efecto antioxidante en el tejido gástrico de ratas injuriados con etanol 70%?

## **1.3 Justificación teórica**

El conocimiento del probable mecanismo gastroprotector del extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” explicaría parcialmente el rol gastroprotector en contra de la gastritis/úlceras y con ello una alternativa fitoterapéutica de bajo costo, ni toxicidad en órganos blancos. Constituiría además una contribución a la validación de su uso como parte de la medicina tradicional en nuestro país.

## **1.4 Justificación práctica:**

Al ser las hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” una planta silvestre, su potencial uso fitoterapéutico promovería un cultivo organizado, racional, proporcionando una nueva actividad económica en los agricultores de las comunidades de la región Nor - Yauyos.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

- Evaluar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” sobre el tejido gástrico de ratas inducido con etanol 70%.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Analizar el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” sobre las enzimas con actividad antioxidante en el tejido gástrico de ratas injuriadas con etanol 70%.

- Cuantificar el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” sobre los metabolitos indicadores del estrés oxidativo en el tejido gástrico de ratas injuriadas con etanol 70%.
- Determinar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/c.

## CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes de investigación

Estudios publicados por Huamán et al., (2006) evidencian que el tratamiento con el extracto acuoso de hojas de *Jungia paniculata* “matico serrano” a las dosis de 200, 600 y 800 mg/kg de peso logran una disminución de los niveles de malondialdehído (MDA) en el homogenizado de tejido gástrico, frente a la injuria con etanol, siendo la dosis de 800 mg/kg con significancia estadística. Huamán, Béjar y Calderón (2006) informan que a la dosis de 600 mg/kg todos los estómagos presentaron células epiteliales descamativas, glándulas gástricas dilatadas y ausencia de úlceras, en comparación con los otros grupos tratados.

Casado et al. (2007) evaluaron la actividad antioxidante de *Jungia paniculata* frente al DPPH, de los extractos acuoso, metanólico y etanólico 50%, demostrándose una buena actividad antioxidante en el extracto etanólico al 50% con un IC<sub>50</sub> de 11,91 ±0,55 µg/mL, seguido del metanólico con 19,48 ±1,15 µg/mL y el acuoso 58,40 ±2,71 µg/mL. El análisis por HPLC de los extractos más activos revelaron la presencia de flavonoides (luteolina, apigenina, sus glicósidos: 7-glucosil-luteolina y 7-glucosil-apigenina) y ácidos fenólicos como componentes mayoritarios, siendo la evaluación de la capacidad antioxidante IC<sub>50</sub> de los flavonoides apigenina y 7-glucosil-apigenina de 1 000 µg/mL demostrando que no es la principal responsable de la actividad antioxidante de los extractos, en cambio los flavonoides luteolina y 7-glucosil-luteolina mostraron valores de IC<sub>50</sub> de 1,29 ±0,11 y 1,91±0,09 µg/mL respectivamente, los cuales demuestran una diferencia significativa con respecto a la vitamina C (2,02 ±0,24 µg/mL).

Enciso et al., (2011) reportaron que los flavonoides extraídos de la especie *Jungia rugosa* Less (matico de la puna) presentan actividad antiinflamatoria y antioxidante en ratas. Wilches et al., (2015), demostraron que la *Jungia rugosa* Less, especie de Ecuador, es efectiva tanto frente a una inflamación

aguda como a una inflamación crónica frente a un modelo experimental en ratones con carragenina y aceite de crotón.

Estos antecedentes permiten iniciar el estudio bioquímico para relacionar los probables roles de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de “matico serrano” sobre los diversos sistemas enzimáticos y no enzimáticos involucrados en mecanismo gastroprotector frente a la injuria producida por el etanol.

## **2.2 Bases Teóricas**

Desde mucho antes que el hombre formara sociedades organizadas, ya utilizaba las bondades que la naturaleza le brindaba para subsistir. Aprendió a reconocer ciertas especies vegetales con propiedades “curativas” que muchas veces fueron identificadas por “ensayo y error”. El conocimiento tradicional es milenario y esto no admite discusión. No obstante, en muchos casos se necesita de la confrontación que permita avalar que una determinada acción terapéutica es efectiva y se emplea con responsabilidad. Foy, (2012).

La naturaleza es una fuente de compuestos biológicos activos, entre ellas las plantas, estas han sido la base de la farmacia y la farmacología. Ellas son remedio en la medicina tradicional empleada por siglos y aun son usados como reserva de compuestos bioactivos con interés farmacéutico y agroquímico. Rehecho et al. (2011).

Por lo tanto la ciencia a través de métodos validados ha conseguido demostrar propiedades de las plantas que por tradición se han empleado, muchas resultaron ser válidas, otras no, y otras potencialmente peligrosas. Los estudios físicos, químicos, farmacológicos y bioquímicos nos permiten reconocer, aislar, cuantificar y evaluar a las sustancias químicas responsables de dichas propiedades medicinales.

### **2.2.1 Taxonomía de *Jungia paniculata***

El matico serrano, *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” es una planta semiarbusciva, silvestre que crece en los flancos de los valles occidentales e interandinos, en climas fríos y húmedos, alcanza 0,8 a 2 m de altura. Presenta un tallo anguloso y ramoso, densamente pubescente, de flores amarillas, hojas pecioladas, numerosas, esparcidas simple y alternas, un pecíolo de 0,5 a 2 cm de largo, contorno suborbicular cortado, haz fuertemente estrigoso, envés densamente blanco velloso, inflorescencia blanco-amarillento, capitulescencias en panículas densas. Crece de manera silvestre en muchas regiones del Perú.

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al 1981, se ubica en las siguientes categorías taxonómicas:

Reino:	PLANTAE
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	ASTERACEAE
Especie:	<b><i>Jungia paniculata</i> (DC.) A. Gray</b>



**Figura 1: *Jungia paniculata*.** Fuente. Datos Tomados de Iconografía Mutisiana: 1162 Real Jard. Bot., Madrid

### **2.2.2 Uso etnofarmacológico de *Jungia paniculata***

Esta planta nativa tiene utilidad terapéutica tradicional muy variada, la parte utilizada son las hojas, como infusión en casos de gastritis, úlceras gástricas, tratamiento de diversas afecciones bronquiales (expectorante y antitusígeno), como emplasto para el tratamiento de heridas, prevención de hemorragia y golpes; en cocimiento es una bebida para “curar” las enfermedades de los riñones y amigdalitis, para el caso de lavados vaginales e inflamación de ovarios se asocia con otras plantas medicinales entre ellas la cola de caballo, salvia, ortiga blanca y amor seco, las cuales

son empleadas también en el tratamiento de enfermedades gástricas, heridas, golpes, vaginitis y amigdalitis. (Valle Grande, 2002).

### **2.2.3 Anatomía del estómago de rata**

El estómago de rata está dividido en tres regiones distintas: estómago proximal, región oxíntica y antro distal. El estómago proximal está revestido con una capa de células escamosas estratificadas con una mucosa no glandular que funciona principalmente como un reservorio. Sus paredes son similares a las del esófago. (Atuma, 2000).

Por el contrario, el corpus o región oxíntica y el antro distal presentan mucosa glandular. Las glándulas del corpus están revestidas con células parietales que secretan ácido clorhídrico, ricas en mitocondrias, células principales que secretan el pepsinógeno y unas pocas células entero endocrinas, que secretan factores humorales. En la mucosa antral hay células endocrinas que participan en la regulación de la secreción de ácido; las células G producen gastrina que estimula la secreción de ácido, mientras que las células T, sensible a los ácidos, producen la somatostatina que inhibe la secreción de ácido. (Atuma, 2000).

Las células epiteliales de la superficie del corpus y el antro distal segregan moco que contribuyen a que a partir de las células mucosas del cuello en la formación de una manta protectora continua de gel, que cubre la superficie de la mucosa. (Atuma, 2000).

### **2.2.4 Fisiopatología del daño en la mucosa gástrica aguda: Inducción aguda por etanol.**

La gastritis es etiológicamente multifactorial, pueden intervenir factores exógenos: *Helicobacter pylori*, AINES, irritantes gástricos, fármacos, **alcohol**, tabaco, cáusticos y radiación; y endógenos: jugo gástrico, pepsina, bilis, jugo pancreático.

Valdivia (2011) afirma que cuando la mucosa gástrica se expone a los agentes lesivos ya mencionados, desarrolla modificaciones morfológicas

ultra estructurales y funcionales ante la injuria. El desarrollo y extensión de la injuria en la mucosa depende de la naturaleza y concentración del agente gastrolesivo.

Tornawski (1995) refiere que la injuria aguda a la mucosa gástrica consiste en una ruptura de la capa estable y de la superficie hidrofóbica, lesión y exfoliación de la superficie epitelial con pérdida de su barrera y función eléctrica, injuria de capas más profundas de la mucosa gástrica incluyendo: células endoteliales microvasculares, zona de células progenitoras y células parietales y principales. El daño del endotelio microvascular conduce a la estasis microvascular, interrupción del suministro de oxígeno, del transporte de nutrientes y de ahí a una necrosis por isquemia.

Zacaria et al., (2016) manifiesta que los factores dañinos incluyen la ingesta de alcohol, la secreción del ácido clorhídrico y pepsina, estrés, dietas no equilibradas, las especies reactivas de oxígeno (ROS), el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) e infección por *Helicobacter pylori*.

El daño en la mucosa gástrica genera estrés oxidativo intracelular, aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, el etanol incrementa la producción de radicales libres especialmente anión superóxido e hidroxilo responsables del daño a la membrana celular causando lipoperoxidación, estos eventos son reportados por Repetto et al., (2002) y Allen et al., (1993).

### **2.2.5 Mecanismo defensivo de la mucosa gastroduodenal**

La habilidad protectora de la mucosa gastroduodenal normal contra factores agresivos endógenos y exógenos es debida a un número de procesos defensivos (que operan dentro y alrededor de la mucosa), es reportado por Tornawski (1995), Hiraishi (1999) y Zacaria et al., (2016)

La primera línea de defensa de la mucosa es una capa estable formada por el gel mucoso y el bicarbonato que cubren la superficie luminal y así mantienen un microambiente neutro en las células superficiales epiteliales.

La segunda línea de defensa está formada por la capa continua de células epiteliales superficiales que segregan moco, bicarbonato y generan prostaglandinas. Debido a la presencia de fosfolípidos dichas células son hidrofóbicas, forman una "barrera" que previene la retro difusión de ácido y pepsina, estos hallazgos concuerdan con Atuma (2002)

Hay una continua renovación celular, usualmente lleva de 3 a 5 días para reemplazar completamente el epitelio superficial y un mayor tiempo (meses) para reemplazar las células glandulares. La injuria superficial al epitelio mucoso es restituida en algunas horas por medio de la migración de células del área del cuello según Allen (1993) y Shorrock (1988)

El endotelio microvascular genera vasodilatadores tales como la prostaciclina y el óxido nítrico (NO), que protegen a la mucosa gástrica contra la injuria y se oponen a la acción de los vasoconstrictores, como leucotrieno C<sub>4</sub>, tromboxano A<sub>2</sub> y endotelina. Cuando la microvasculatura está dañada sus células endoteliales inician la reparación y reconstrucción de la trama microvascular a través de la angiogénesis.

Hasta hace poco la matriz extracelular era considerada solo soporte de las células epiteliales, trabajos recientes indican que ella juega un rol activo en las funciones de la mucosa. Sus componentes están unidos a través de integrinas con el citoesqueleto celular permitiendo la transferencia bidireccional de información respecto a la forma de la célula y su crecimiento. Tornawski (1998) y Repetto (2002).

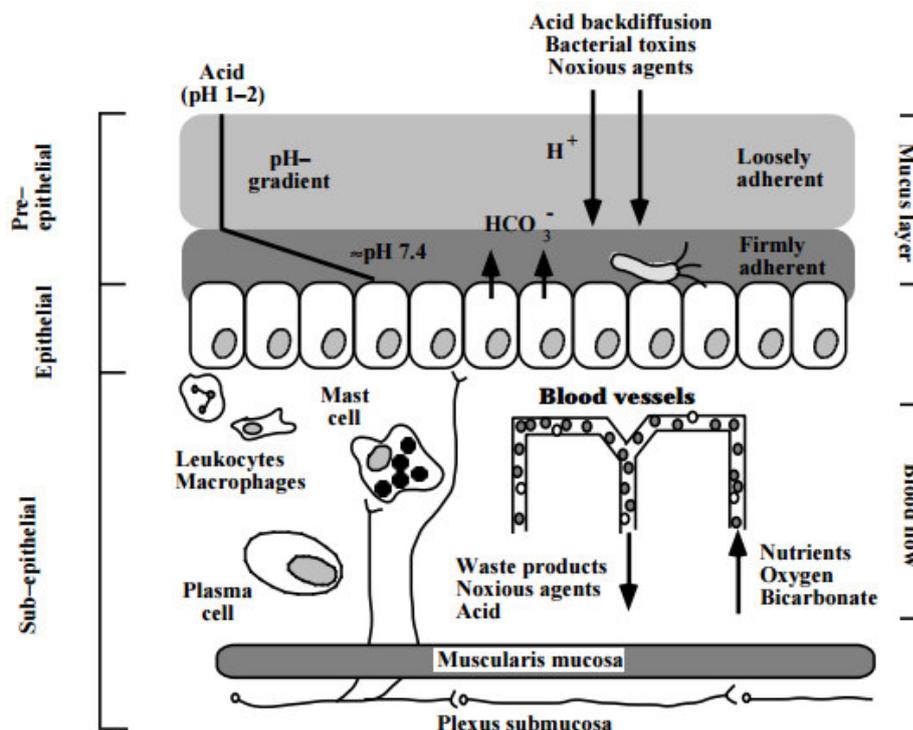


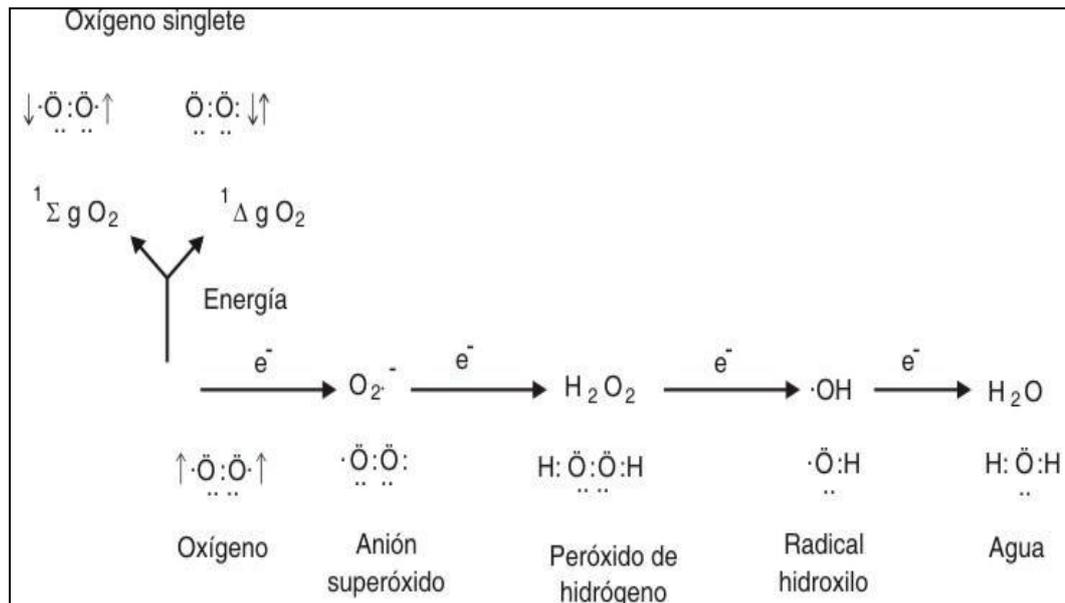
Figura 2.- Diagrama esquemático de los tres niveles de defensa del estómago. Fuente. Tomado de Atuma 2000.

### 2.2.6 Radicales libres

Venéreo (2002), desde el punto de vista químico, define a los radicales libres como todas aquellas especies químicas, con carga o no, que en su estructura presentan un electrón desapareado en el orbital externo.

En los sistemas biológicos estas especies químicas cuando son de bajo peso molecular son muy reactivas, con una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se generan y son difíciles de cuantificar.

Las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) o sustancias prooxidantes son: radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), óxido nítrico (NO), peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), semiquinona (Q), ozono ( $\text{O}_3$ ), estos se generan a nivel intracelular y extracelular, (Martínez, 2005).



**Figura 3.- Generación de especies reactivas de oxígenos (ROS): Reducción del oxígeno molecular.** Fuente. Tomado de Martínez 2005.

Las enzimas fuentes de radicales libres derivadas del oxígeno involucradas son: la xantina oxidasa, la indolamin dioxigenasa, la triptófano dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoaminoxidasa y la NADPH oxidasa. (Jerlick et al., 2000).

El daño celular producido por las ROS ocurre sobre diferentes biomoléculas entre ellas se encuentran los lípidos, este daño es denominado peroxidación lipídica o lipoperoxidación, afecta principalmente a las moléculas que contienen ácidos grasos poliinsaturados (fosfolípidos), y altera la permeabilidad de la membrana celular, se forma edema y puede conducir a la muerte celular.

La lipoperoxidación lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos; una vez formados, estos son los responsables de los efectos citotóxicos. (Jerlick et al., 2000).

En cuanto a las proteínas, las ROS actúan principalmente sobre los anillos aromáticos y los grupos tío (-SH) de los aminoácidos. Díaz y Membrillo (2006) indican que las proteínas ricas en los aminoácidos fenilalanina, tirosina, cisteína, histidina y metionina pueden sufrir alteraciones estructurales y finalmente puede derivar en la pérdida de la actividad enzimática, a la alteración estructural por rotura o por formación de puente disulfuro, intra o intercatenarios.

Las ROS también afectan el ADN nuclear y mitocondrial produciendo mutaciones, ya sea con pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico. Zorrilla et al., (2004), hallaron que el daño puede realizarse por la alteración (inactivación/pérdida) de algunos genes supresores de tumores. Es el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) la ROS que más daño le hace al ADN, puede atacar tanto purinas como pirimidinas formando aductos. (Bhattacharya, 2015).

### **2.2.7 Antioxidantes**

El organismo tiene sistemas de defensa contra las ROS, los cuales son generados de manera fisiológica o patológica, estas sustancias son denominadas antioxidantes, los cuales según su origen son clasificados en endógenos y exógenos.

Entre los denominados antioxidantes endógenos se encuentran: los antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) y los no enzimáticos (GSH, ácido úrico, coenzima Q). Cuando la producción de las ROS se incrementa en casos patológicos, se altera el equilibrio con los sistemas antioxidantes ocasionando un desbalance o estrés oxidativo. (Avello y Suwalsky, 2006).

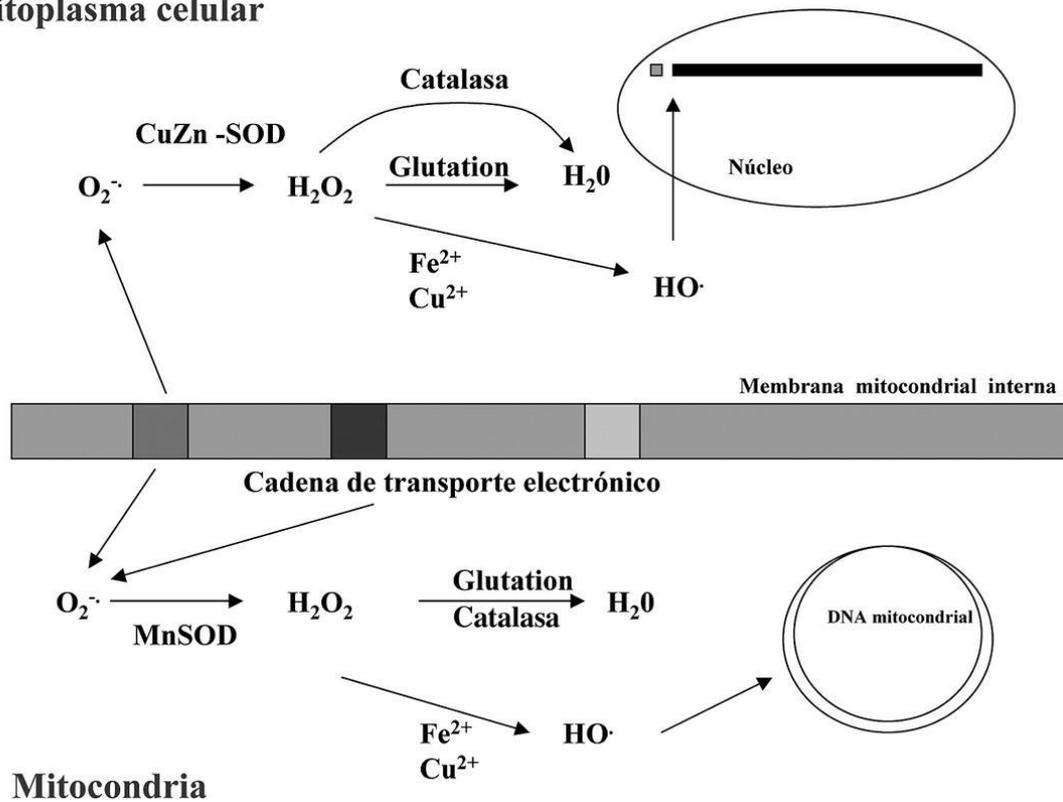
#### **2.2.7.1 Antioxidantes enzimáticos**

La catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) forma parte del sistema antioxidante involucrada en la destrucción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  generado durante el metabolismo celular, hasta  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Está ampliamente

distribuida en el organismo humano, con una alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y los epitelios, ya nivel celular se localiza en las mitocondrias y peroxisomas, excepto en los eritrocitos que se ubica en el citosol. Es una metaloproteína homotetramérica, cada subunidad contiene un grupo hemo, presenta dos funciones fundamentales: catalítica y peroxidativa, forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno convirtiéndola en agua. Su  $K_m$  es de 2,75 mM. (Céspedes et al., 1996).

Las Superóxido dismutasa (SOD), (E.C. 1.15.1.1), dismutan el oxígeno radical libre para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno. García et al., (1995) en su artículo científico indican que dicha enzima dismuta al anión superóxido. Esta ampliamente distribuida en el organismo y pertenece al grupo de metaloenzimas: SOD-CuZn contiene cobre y cinc en su sitio activo, se encuentra en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; SOD-Mn, contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; SOD-Fe contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. Coli*. (Venéreo et al., 2002).

### Citoplasma celular



**Figura 4.- Producción de radicales superóxido por la cadena de transporte de electrones mitocondrial.** Fuente. Tomado de [:/TESIS/enzimas%20antioxidantes%20figura.html](http://TESIS/enzimas%20antioxidantes%20figura.html).

#### 2.2.7.2 Antioxidantes no enzimáticos: endógenos y exógenos

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos más importantes están constituidos principalmente por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995).

El **glutatió**n (GSH), es un tripéptido (cis – glu – gli ) intracelular presente con todas las células en concentraciones mili molares y las protege contra diferentes ROS. Por lo tanto mantiene el balance redox intracelular al eliminar a los ROS y xenobióticos. Tanto el GSH como otras moléculas que contiene tiol (-SH) tiene alto poder reductor y por consiguiente posee propiedades antioxidantes, ya que pueden ceder un electrón a las ROS y ala especies reactivas de nitrógeno

(RNS), disminuyendo de esta manera su reactividad. Se encuentra como GSH alrededor de 98% y en su forma oxidada (GS-SG) alrededor de 1,5%. Está presente en altas concentraciones en el hígado, mucosa gástrica. De Leve y Kaplowitz (1991)

En ciertas situaciones es necesario complementar nuestra dieta con sustancias antioxidantes (exógenos) presentes en los vegetales (frutas y verduras) con la finalidad de restablecer el equilibrio oxidante-antioxidante.

Morante (2004) y San Miguel et al., (2009), con respecto al estrés oxidativo, señalan que los antioxidantes exógenos son los denominados nutrientes, tales como la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocotrienol),  $\beta$ -caroteno (pro vitamina A, la vitamina C, carotenoides, compuestos fenólicos dichos nutrientes están ampliamente distribuidos en los alimentos vegetales que forma parte de nuestra dieta.

Jojeux et al., (1995) encontraron que en los últimos años la ingesta de metabolitos secundarios con actividad antioxidante (taninos, flavonoides, cumarinas, terpenoides), resultan beneficiosas para el hombre. Muchos de estos compuestos poseen diversas formas de expresar dicha actividad, como por ejemplo: captadores de radicales libres, inductores enzimas antioxidantes e inhibidores de prooxidantes.

**Polifenoles**, constituye un grupo de metabolitos secundarios propio de las plantas, caracterizado por la presencia de uno o varios anillos fenólicos de allí su denominación. Los principales son los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides.

La capacidad de los polifenoles para modular la actividad de diferentes enzimas, y para interferir consecuentemente en mecanismo de señalización y en distintos procesos celulares, puede deberse, al menos en parte, a las características fisicoquímicas, que

les permiten participar en distintas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción. (Quiñones et al., 2012).

Son en realidad los principales antioxidantes de la dieta, y su ingesta es 10 veces superior a la vitamina C o los carotenoides.

En el caso de los flavonoides su actividad antioxidante resulta de una combinación de sus propiedades donadores de protones, hidroxilo y quelantes de hierro. Son secuestradores de radicales libres: anión superóxido, radicales hidroxilo, hidroperóxido y peróxidos lipídicos, así mismo son conocidos antiinflamatorios porque inhiben a las enzimas ciclooxigenasa y 5-lipooxigenasa. (Dell'Agli et al., 2004).

### **2.2.8 Estrés oxidativo**

Es un estado generado por el desequilibrio entre la producción de radicales libres, especies prooxidantes y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente las especies reactivas intermedias o reparar el daño resultante.

El estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de enfermedades crónicas y degenerativas, como el cáncer, artritis, envejecimiento, desordenes autoinmune, enfermedades cardiovascular y neurodegenerativa. (Liang et al., 2008).

En las células de los mamíferos, el estrés oxidativo conduce al incremento de niveles de  $\text{Ca}^{++}$  libre y hierro intracelular, el excesivo aumento del calcio intracelular puede causar fragmentación del ADN por activación de las endonucleasas. (Orrenius et al., 2003).

Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica.

Desbalances en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

### 2.2.8.1 Estrés oxidativo en la mucosa gástrica inducido por etanol

El estrés oxidativo inducido por etanol está vinculado a su metabolismo. Hay tres rutas metabólicas que se relacionan con las siguientes enzimas: alcohol deshidrogenasa, sistema microsomal de oxidación del etanol (MEOS) y catalasa. MEOS y catalasa pueden producir ROS que afectan el sistema antioxidante. (Kumar y Vaseduvan, 2007).

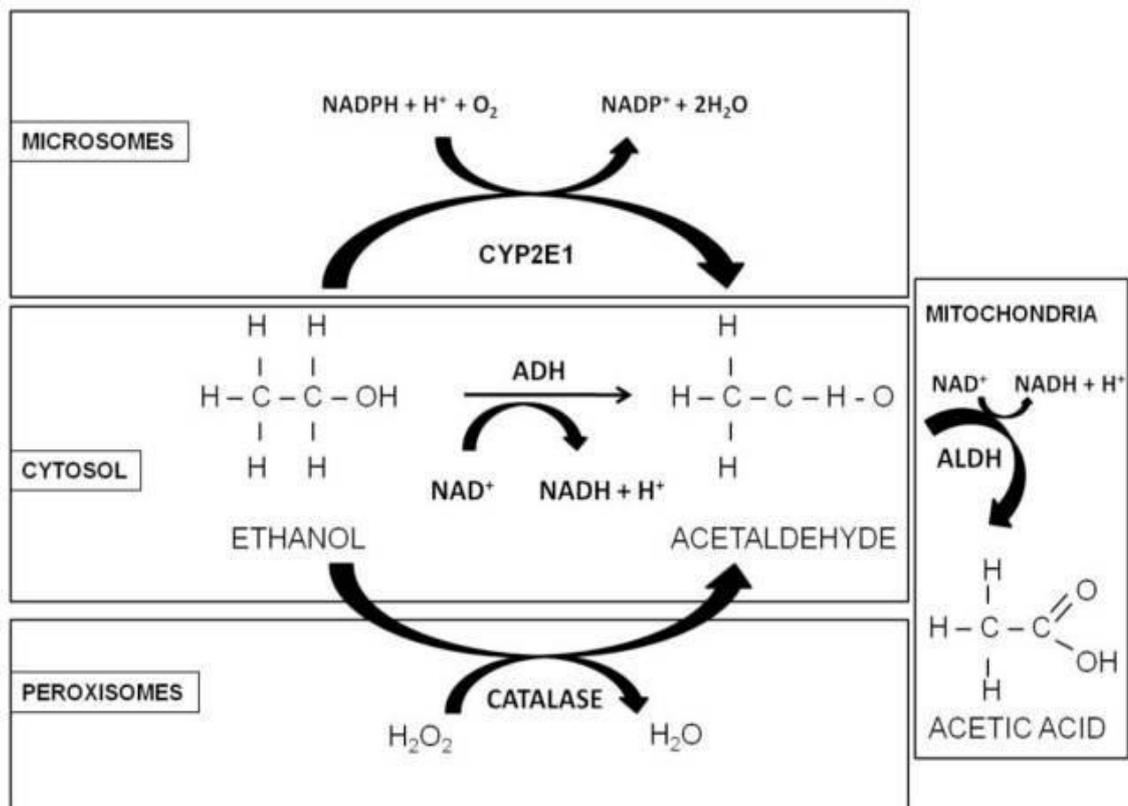


Figura 5.- Rutas del metabolismo del alcohol. Fuente. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. Int. J. Environ. Res. Public Health 2010.

También está relacionada con la formación de un ambiente favorable al estrés oxidativo, por ejemplo la hipoxia, endotoxemia y liberación de citoquinas.

El etanol es considerado un factor de riesgo en el desarrollo de úlceras gástricas, este penetra rápidamente la mucosa gástrica debido a su propiedad física de solubilizar el moco gástrico. Por consiguiente expone a la mucosa gástrica a la acción hidrolítica y proteolítica del ácido clorhídrico y la pepsina respectivamente, causando un mayor daño a la membrana. (Kumar et al., 2009).

El daño se da por la generación de las ROS, el proceso de intoxicación aguda se inicia con el daño a la mucosa gástrica, que incluye un proceso inflamatorio por activación de los fagocitos, los cuales producen anión superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico y ácido hipocloroso. (Yoshikawa et al., 1989).

Hay liberación de ácido araquidónico, formación de peróxidos enzimáticos por lipooxigenasa y ciclooxigenasa. Los peróxidos generan radicales alcohilo y peroxilo, los cuales pueden dañar otros lípidos y proteínas.

Hay liberación de iones de metales de transición  $Fe^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  al estimular el cambio de peróxido a radical hidroxilo  $OH^{\cdot}$  Hay consumo de GSH y conversión de xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa, su posible liberación a partir de las células dañadas producen daño sistémico. (Repetto y Llesuy, 2002).

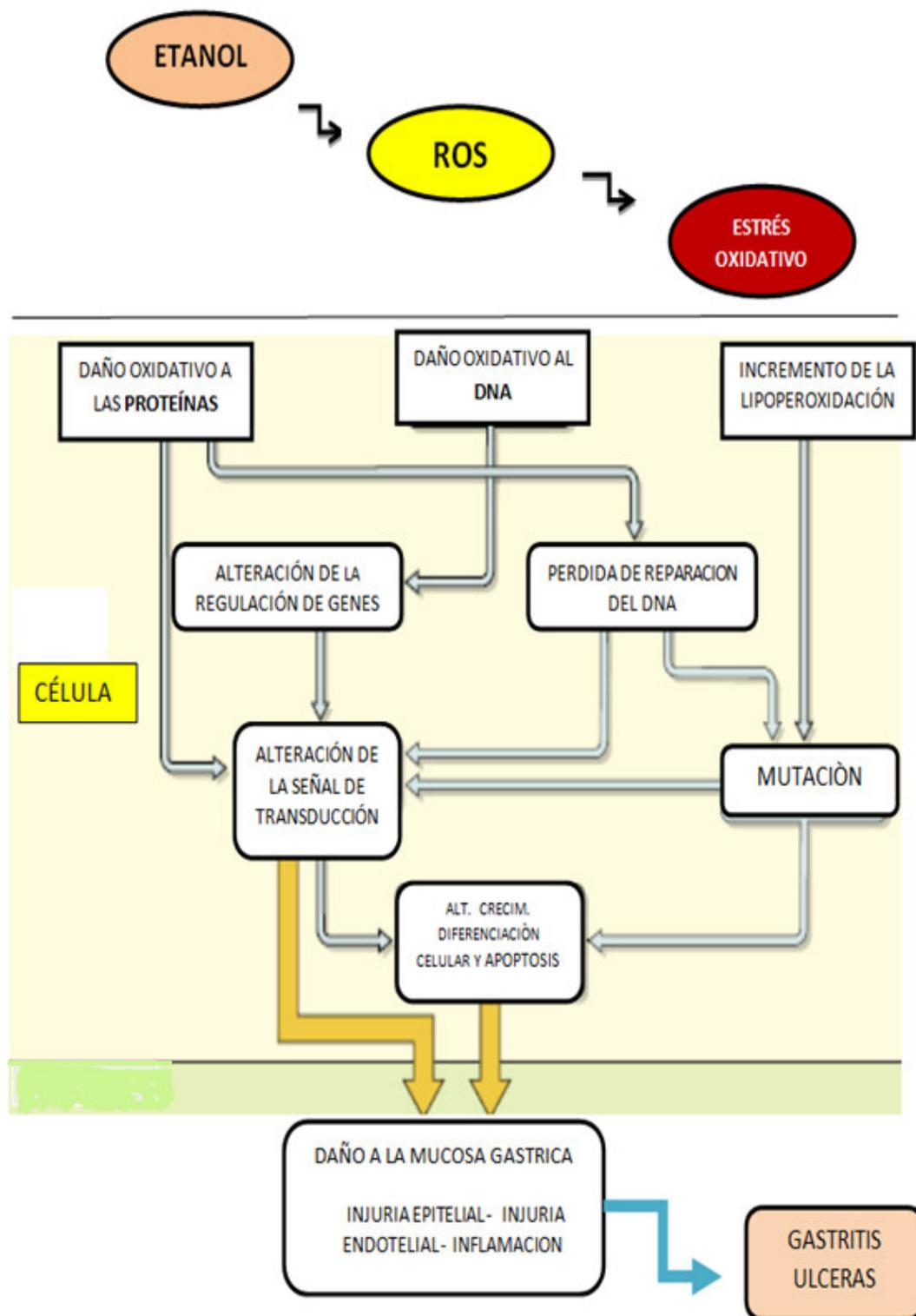


Figura 6.- Esquema modificado del daño oxidativo por etanol. Fuente. Tomada de Bhattacharya et al., 2014.

## CAPITULO 3: METODOLOGIA

### 3.1 Tipo de investigación

Es un estudio analítico, cuantitativo con diseño experimental

### 3.2 Materiales

#### 3.2.1 Material biológico

**Planta:** Hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano”

**Animales:** Ratas variedad *Sprague - Dawley*

Ratones cepa Balb/c

#### 3.2.2 Materiales de laboratorio

**De vidrio, metal y plástico:** Embudos, vaso de precipitado, tubos de ensayo, placas de vidrio, pipetas, probeta, bagueta, matraz aforado, puntas para micropipeta, ependorf, gradillas, guantes, pizeta.

#### 3.2.3 Equipos e Instrumentos

- Homogenizador TissueTearor model 985370, 5 000 – 32 000 RPM. 1,2 A. BIOSPEC PRODUCTS, INC.
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC 2-B. Rotor SS34.
- Centrífuga para ependorf HERMLE Z 229 BHG. Rotor fijo.
- Micropipeta: Hirschmann Laborgerate, Accumex
- Incubadora Pelletier
- Estufa Unics
- Computadora Sync Master 591 s
- Espectrofotómetro Spectro UV – VIS Labomed Inc

- Molino de cuchilla Willey
- Balanza analítica Sartorius BP 2
- Bidestilador
- Agitador
- Equipo de cirugía Rottmann Instruments
- Baño Maria Polytherm Bench Scale Equipment

### **3.2.4 Reactivos**

Todos los reactivos fueron de grado analítico.

De SIGMA CHEMICAL se utilizaron: Ácido formil fórmico (Ácido Glioxílico monohidratado) G-4627; 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH); Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA); 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox); 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico ácido)3-carboxyl-4-nitrophenil disulfide (DTNB) Ellman's Reagent; Trizma HCl; Trizma base; Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA); Acido tricloacético (TCA); 1,2,3-trihidroxibenceno (Pirogalol); Dietilenetriaminopenta Acetic Acid (DTPA); Albúmina bovina.

De los laboratorios MERCK: Metanol absoluto; Ácido ascórbico D-6100 Darmstadt pro-analysis; Cloruro de potasio (KCl); Éter; Fosfato monohidrogenado de potasio; Fosfato dihidrogenado de potasio.

Los demás reactivos fueron también de grado analítico: Alcohol 70% LAQUIFAZA; Ácido tricloroacético (TCA); NaCl Riedel-de-Haën AG; CaCl<sub>2</sub> Fisher Scientific Company; NaHCO<sub>3</sub> JT Baker Chemical; Glucosa.

### **3.3 Variables**

- **Variable independiente:** Extracto hidroalcohólico 70% de hojas de *Jungia paniculata*. Dosis de 600 mg/kg.

- **Variable dependiente:** Efecto gastroprotector, respuesta del tejido gástrico sometido a injuria con etanol 70% sobre las enzimas con actividad antioxidante.

### **3.4 Método experimental**

#### ***3.4.1 Recolección y preparación de la muestra vegetal***

Las hojas de la especie *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano”, fueron recolectadas en la comunidad de Laraos, ubicada a 3 400 metros de altura, Provincia de Yauyos, Departamento de Lima, enero del año 2006. Su posición geográfica es 75° 30´ - 76° 20´ oeste y 12° 00´ - 13° 00´ sur.

La muestra vegetal fue envuelta en papel kraft y colocada en bolsas oscuras de polietileno previamente saturadas con alcohol al 96%, con la finalidad de estabilizarla y conservarla hasta su llegada a Lima.

Las hojas fueron desecadas en estufa a 40°C por dos días hasta peso constante, luego se trituraron en un molino de cuchillas obteniéndose un polvo fino, se guardó en un frasco de boca ancha color ámbar debidamente rotulado y conservado a temperatura ambiente.

#### ***3.4.2 Clasificación de la muestra***

La clasificación taxonómica de la planta (hojas, tallo, flor, raíz), fue realizada por el Biólogo colegiado y autorizado por el INRENA Hamilton W. Beltrán S., de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al., 1981. (**Anexo 1**).

#### ***3.4.3 Obtención del extracto hidroalcohólico 70 %***

Las hojas molidas fueron pesadas y maceradas en alcohol al 70% en una relación 2:1 de hojas y solvente, por 7 días en un frasco de color ámbar a temperatura ambiente y con movimientos rotatorios durante 15 minutos cada día.

Concluida la maceración, se filtró a través de varias capas de gasa, la solución filtrada fue evaporada hasta sequedad en una estufa a 40° C. El extracto seco obtenido se empleó en los ensayos biológicos y bioquímicos.

#### **3.4.4 Marcha fitoquímica: Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios**

Se realizó la determinación cualitativa del extracto seco de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano”, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Se utilizaron reactivos específicos para la identificación de los diversos metabolitos, aplicando las técnicas de Lock de Ugaz (1993)

- a. **Reacción de Molisch:** Gotas de muestra problema + gotas de S. R. de Molisch “A” (alfa naftol 2% en alcohol), agitar + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado por las paredes del tubo. La reacción será positiva cuando se forme en la interfase un anillo de color violeta.
- b. **Reacción de Ninhidrina:** Gotas de muestra problema + reactivo de Ninhidrina (Ninhidrina al 1% en etanol). La aparición de un color violáceo nos indicará la presencia de aminoácidos libres y grupos amino (calentar en algunos casos).
- c. **Reacción de Shinoda:** Gotas de muestra problema + reactivo de Shinoda (Magnesio +gotas de HCl concentrado). La formación de un color rojo nos indicará positivo para chalconas y auronas. Negativo (-) para catequinas e isoflavona.
- d. **Reacción de FeCl<sub>3</sub>:** Gotas de muestra problema + reactivo de Fe Cl<sub>3</sub>. Si la solución se torna verde-azulada será positivo para compuesto fenólicos.
- e. **Reacción de Lieberman - Burchardat:** Gotas de muestra problema + reactivo de Lieberman-Burchardat (gotas de cloroformo + gotas de anhídrido acético + gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado). La aparición en zona de los colores verde, azul, naranja o rojo nos indicará presencia de esteroides o triterpenoides.

- f. **Reacción de Borntrager:** Gotas de muestra problema + reactivo de Borntrager (gotas de hidróxido de sodio 5%). La aparición de color rojo nos indicará presencia de naftoquinonas, antronas y antranonas.
- g. **Reacción de Mayer:** Gotas de muestra problema + gotas de R. Mayer (tetrayodomercuriato potásico). La presencia de turbidez o precipitado blanco nos indica positivo para alcaloides.
- h. **Reacción de Dragendorff:** Gotas de muestra problema + gotas de reactivo Dragendorff (tetrayodobismutatopotásico) medio ligeramente ácido. La formación de precipitado naranja o rojo naranja nos indica la presencia de alcaloides.
- i. **Reacción de la espuma:** 1 g de muestra problema + 10 mL de agua destilada, agitar fuertemente por 1 minuto. La producción de espuma por 15 minutos de 0,5 a 1 cm de altura indica la presencia de saponina.
- j. **Reacción de Vainillín sulfúrico:** Gotas de muestra problema + gotas de reactivo de Vainillín sulfúrico. La formación en zona de anillo rojizo-violáceo confirma la presencia de glucósidos.
- k. **Reacción de la gelatina:** 1 mL del reactivo de gelatina (1 g de gelatina en 100 mL de agua, 10 g de NaCl) + gotas de la muestra problema. Un precipitado denso blanquecino indica presencia de taninos.
- l. **Agua de bromo:** 2 mL del reactivo de agua de bromo + gotas de la muestra problema. La formación de precipitado nos confirma la presencia de taninos condensados.

#### ***3.4.5 Determinación de la actividad antirradical libre (Capacidad Antioxidante Total) del extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata*.***

Se empleó la técnica con el radical libre DPPH según Jojeux (1995).

**Fundamento:** El DPPH es un radical libre estable, sólido cristalino de color violeta, soluble en metanol o etanol, y en presencia de una sustancia

donadora de un átomo de hidrógeno pierde el color violeta y se torna un amarillo pálido cuando se reduce.

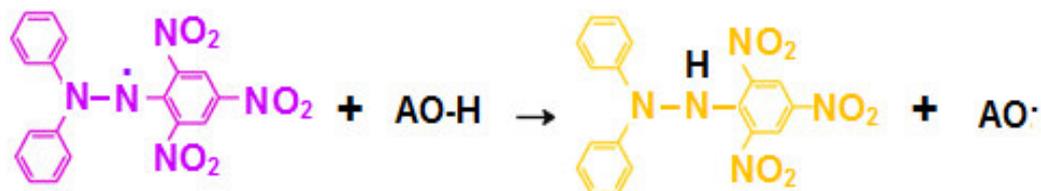


Figura 7.- **Reducción del DPPH.** Fuente. DPPH-test: Determination of scavenger properties - Baltic analytics.

**Reactivos:** Solución de DPPH 2mg% en metanol, Solución Trolox 36 µg/mL en etanol al 50% con agua bidestilada, Vitamina C 24 µg/mL en agua bidestilada.

#### Procedimiento:

1. A partir de una solución de 300 µg/mL del extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” se prepararon 5 diluciones en agua bidestilada cuyas concentraciones resultantes en el tubo de reacción fueron 8,33; 6,70; 5,00; 3,34; 1,67 µg/mL.
2. Los estándares antioxidantes utilizados fueron: Trolox y Vitamina C. Se preparó una curva patrón con cada estándar. Las concentraciones finales de Trolox en el tubo de reacción fue de 3,6; 3,0; 2,4; 1,8 y 0,9 µg/mL y de vitamina C fue 2,4; 2,0; 1,6; 1,2 y 0,8 µg/mL.
3. El procedimiento para cada dilución la muestra problema y los estándares, se realizó según el cuadro N°1

Cuadro 1.- **Determinación del IC<sub>50</sub> de *Jungia paniculata* y estándares**

Tubos	Blanco	DPPH	Trolox	Vit. C	MP
mL Agua	0,4	0,4	-	-	-
mL Etanol	0,8	-	-	-	-
mL DPPH	-	0,8	0,8	0,8	0,8
mL Trolox	-	-	0,4	-	-
mL Vit. C	-	-	-	0,4	-
mL MP	-	-	-	-	0,4

La reacción se llevó a cabo protegido de la luz por 30 minutos, luego fueron leídos en el espectrofotómetro a 517 nm.

Las muestras problemas diluidas y los estándares se procesaron por triplicado para obtener un promedio de absorbancias para cada una de las soluciones.

Con los promedios obtenidos se construyeron las respectivas curvas de calibración.

Los resultados se expresaron en % de captación de DPPH, IC<sub>50</sub>, TEAC y VCEAC

**Porcentaje de captación de DPPH**, está referido al porcentaje de reducción que presenta el extracto a una concentración determinada

$$\% \text{ de captación de DPPH} = \frac{ABS_{(DPPH-MP)}}{ABS_{DPPH}} \times 100$$

**IC<sub>50</sub>**, es definido como la cantidad del extracto o sustancia antioxidante de referencia, capaz de reducir al 50% la concentración inicial de DPPH. El cual se determina por la ecuación de la recta obtenida de la gráfica de la curva de calibración.

**Capacidad antioxidante equivalente a la Vitamina C. (VCEAC).**- Se obtiene de la relación entre el valor de IC<sub>50</sub> de la Vitamina C respecto al IC<sub>50</sub> de *Jungia paniculata*.

$$VCEAC = \frac{IC_{50} \text{ Vitamina C}}{IC_{50} J. \text{ paniculata}}$$

**Capacidad antioxidante equivalente al Trolox. (TEAC).**- Se obtiene de la relación entre el valor de IC<sub>50</sub> del Trolox respecto a la IC<sub>50</sub> de *Jungia paniculata*.

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} J. \text{ paniculata}}$$

### **3.4.6 Modelo experimental de Inducción de la lesión gástrica**

La lesión gástrica se realizó en 24 ratas machos *Sprague – Dowley* procedente del bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) con un peso aproximado de  $283 \pm 12$  g; los cuales tuvieron 7 días de aclimatación en el bioterio de la Facultad de Medicina, considerando periodos de 12 horas de luz natural y 12 horas de oscuridad.

Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en cuatro grupos, recibieron alimentación balanceada adquirida en UNALM y agua potable *ad libitum*.

La injuria se realizó de acuerdo al modelo de Robert et al., sustentado por el CYTED (1995), esta consiste en la administración del agente injuriante, etanol al 70% vía per oral (1mL/100 g de peso del animal) previo ayuno de 12 horas.

A primera hora las ratas fueron pesadas y distribuidas en cuatro grupos para recibir el tratamiento correspondiente vía per oral:

**Grupo I (Control negativo):** Se administró por vía per oral solución salina fisiológica (1 mL/100 g de peso), transcurrido una hora de tratamiento se administró nuevamente solución fisiológica a la misma dosis.

**Grupo II (Control positivo):** Se administró solución salina fisiológica (1mL/100 g de peso), a la hora recibió etanol al 70% (1 mL/100g de peso).

**Grupo III:** Recibió el extracto hidroalcohólico (600 mg/kg de peso), transcurrido una hora recibió etanol al 70% (1mL/100 g de peso).

**Grupo IV:** Recibió el extracto hidroalcohólico (600 mg/kg de peso) a la hora se administró solución fisiológica (1 mL/100 g de peso).

Transcurrido una hora del segundo tratamiento todos los animales fueron sacrificados con vapores de éter dietílico y se extrajeron los estómagos por laparotomía.

El estómago fue abierto por la curvatura mayor, se seleccionó la porción glandular el cual fue lavado con solución fría de KCl 0,134 mol/L, todo el procedimiento se realiza en un ambiente frío para preservar la actividad de las enzimas.

### **3.4.7 Evaluación de las lesiones gástricas agudas**

En la evaluación de los resultados del tratamiento agudo, se consideró el número total de úlceras y el promedio de los índices de lesión que fueron determinados de acuerdo con el grado de lesión, descrito a continuación:

- a. Coloración de la mucosa
  - normal..... 1 punto
  - hiperémica..... 1 punto
  - descolorida..... 1 punto
- b. Pérdida de los pliegues de la mucosa..... 1 punto
- c. Petequias
  - leve..... 1 punto
  - moderado..... 2 puntos
  - fuerte..... 3 puntos
- d. Edema
  - leve..... 1 punto
  - moderado..... 2 puntos
  - fuerte..... 3 puntos
- e. Hemorragia
  - leve..... 1 punto
  - moderado..... 2 puntos
  - fuerte..... 3 puntos
- f. Pérdida de moco
  - leve..... 1 punto
  - moderado..... 2 puntos
  - fuerte..... 3 puntos
- g. Lesiones necro hemorrágicas (Úlceras)
  - hasta 1 mm..... 1 punto
  - mayor de 1 mm..... 1 punto x mm

- perforadas..... 5 puntos x mm
- h. Exudado celular..... 3 puntos

Se considera leve cuando el área afectada es menor al 25%, moderado cuando llega al 50% y fuerte cuando es mayor que el 50%. (CYTED, 2001).

### **3.4.8 Preparación del homogenizado de tejido gástrico**

Se pesó la porción glandular del estómago y se homogenizó con buffer fosfato de potasio 0,01 mol/L pH 7,4. A una concentración de homogenizado del 10% se llevó a centrifugar a 2 000 rpm a 4° C por 5 minutos con la finalidad de obtener un homogenizado libre de detritus. Los diferentes ensayos se realizaron en el sobrenadante, denominado para este estudio **homogenizado**.

### **3.4.9 Determinación de los indicadores bioquímicos en homogenizado de estómago.**

#### **3.4.9.1 Indicadores bioquímicos antioxidante con actividad enzimática**

- Actividad de la superóxido dismutasa (SOD).
- Actividad de la catalasa (CAT).

##### **3.4.9.1.1 Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD)**

Se empleó la técnica propuesta por Marklund S. y Marklund G. (1974)

**Fundamento:** Se basa en la capacidad de la SOD para inhibir la autooxidación del pirogalol en medio alcalino ( pH 8,2 ) por liberación de superóxido. Este método es una prueba cinética evaluada a una longitud de onda de 420 nm que corresponde a la fracción de pirogalina de color amarillo.

**Procedimiento:** Se utilizó el siguiente protocolo:

1. Autooxidación del pirogalol: En una cubeta se colocó 950  $\mu\text{L}$  de Buffer Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,2 en DPTA 1mmol/L, se incubó en baño maría a 37°C por un minuto, se agregó 50  $\mu\text{L}$  de pirogalol y se llevó al espectrofotómetro para medir sus cambios de absorbancia durante cuatro minutos. El promedio del cambio de absorbancia por minuto deben ubicarse en el rango de 0,02  $\pm$  10%.
2. Inhibición de la Autooxidación: En una cubeta de cuarzo (1mL) se colocó 900  $\mu\text{L}$  de Buffer Tris-HCl 0,05 mol/L pH 8,2 en DPTA 1mmol/L, más 50  $\mu\text{L}$  del homogenizado y se incubó en baño María a 37°C por un minuto.

Luego se añadió 50  $\mu\text{L}$  de pirogalol 2 mmol/L en HCl 0,01 mol/L, se mezcló y colocó en el espectrofotómetro para registrar las lecturas de las absorbancias a intervalos de un minuto durante cuatro minutos. El promedio de las absorbancias por minutos debe estar en un rango de 0,01  $\pm$  10%.

**Unidad SOD:** Se define como la cantidad de enzima requerida para inhibir la autooxidación del pirogalol en un 50%. El cual representa la mitad del cambio de absorbancia (0,01  $\pm$ 10% del pirogalol) por minuto.

La actividad específica se expresó en USOD/mg proteína, mediante la siguiente fórmula:

$$Act. Espec. (USOD/mg prot) = \left( \frac{USOD}{Abs_{MP}} \right) \left( \frac{VRx}{V_{homo}} \right) \left( \frac{1 mL homog.}{mg prot.} \right)$$

USOD = Unidades de superoxido dismutasa

VRx = Volumen de la reacción (1 000  $\mu\text{L}$ )

V<sub>homo</sub> = Volumen del homogenizado (50  $\mu\text{L}$ )

### 3.4.9.1.2 Actividad de la catalasa (CAT)

Se empleó la técnica de Aebi. (1984)

**Fundamento:** Se fundamenta en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de la catalasa evaluado a 240 nm en un minuto.

**Procedimiento:** El homogenizado se diluyó 1/60, a partir del cual se tomó 0,8 mL más 0,4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mmol/L, los tiempos a evaluar en el espectrofotómetro fueron: 15; 30; 45 y 60 segundos.

**Unidad CAT:** μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido en un minuto bajo las condiciones de ensayo.

Los resultados se expresaron en actividad específica mediante la siguiente fórmula:

$$Cat \text{ U/mg proteína} = \frac{\Delta Abs / \text{min} \times Vt \times Fd \times mL \text{ homog.}}{43,6 \times 10^{-3} \mu M^{-1} cm^{-1} \times V_{MP} \times mg \text{ prot.}}$$

Δ Abs / min = Variación de la absorbancia en un minuto.  
 43,6 x 10<sup>-3</sup> μM<sup>-1</sup> = Coeficiente de extinción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 Fd = 60 factor de dilución.  
 V<sub>MP</sub> = 0,8 mL

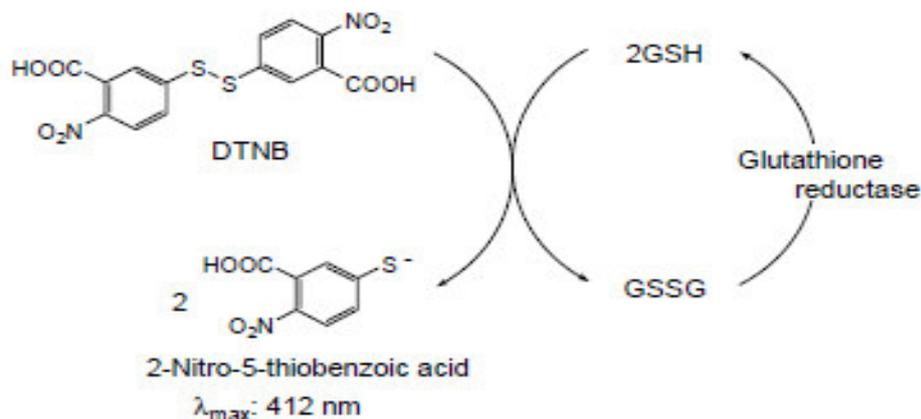
### 3.4.9.2 Indicadores bioquímicos de estrés oxidativo

- Niveles de GSH reducido y total.
- Niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

#### 3.4.9.2.1 Determinación de GSH reducido

Se aplicó el método de Boyne y Ellman (1972)

**Fundamento:** Se basa en la oxidación de los grupos sulfhidrilos (GSH) por el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) obteniéndose como producto el ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), la cual es leída a 412 nm.



*Figura 8.- Identificación del glutatión.* Fuente. Tomada de Principle of Total Glutathione Quantification Kit.

**Procedimiento:** Se desproteinizó 950  $\mu\text{L}$  del homogenizado con 50  $\mu\text{L}$  de TCA al 100%, se agitó enérgicamente y llevó a centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos.

El estándar de GSH que se preparó fue de 0,4 mmol/L en TCA al 5%.

Se aplicó el procedimiento según cuadro N° 2

**Cuadro 2.- Determinación de los niveles de GSH reducido en homogenizado gástrico.**

Tubos	Blanco	St 1	St 2	Muestras
mL Buffer fosfato de potasio pH 6,8 0,01 mol/L	1	1	1	1
mL H <sub>2</sub> O	0,2	0,12	0,1	--
mL St GSH 0,4 mmol/L	--	0,08	0,1	--
mL desproteinizado	--	--	--	0,2

Se colocó en baño María 67°C por 5 minutos, luego se enfrió y agregó 0,2 mL de DTNB de una concentración de 1,5 mg/mL en buffer fosfato de potasio 0,5 mol/L pH 6,8. Transcurrido los 5 minutos se determinó la absorbancia a 412 nm, los resultados fueron

expresados en nmol/g de tejido, el cual fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$\left[ \text{GSH}^{\text{nmol}} / \text{g tejido} \right] = \frac{\text{nmol}_{St} \times \text{Abs}_{MP} \times Vt}{\text{Abs}_{St} \times VR \times W}$$

VR = Volumen real del homogenizado (0,19 mL).

W = gramos de tejido en 100 mL de homogenizado (aproximadamente 10%w/v)

Vt = Volumen total del tubo de reacción (1,4 mL).

#### 3.4.9.2.2 Determinación de GSH Total

La reducción de los grupos sulfhidrilos presentes en el GS-SG, se obtuvo mediante la actividad reductora del sistema vitamina C / ácido Glioxílico en una proporción de 2:1 en buffer fosfato de potasio 0,5 mol/L pH 6,8. Este método se aplicó en el sobrenadante del desproteinizado con TCA 100%.

La determinación de GSH total se realizó según el procedimiento del Cuadro N° 03.

#### Cuadro 3.- Determinación de los niveles de GSH total en homogenizado gástrico

Tubos	Blanco	St 1	St 2	Muestras
mL Vit. C / Ac. Glioxílico	1	1	1	1
mL H <sub>2</sub> O	0,2	0,12	0,1	--
mL St GSH 0,4 mmol/L	--	0,08	0,1	--
mL desproteinizado	--	--	--	0,2

Se colocó en baño maría 67°C por 5 minutos, luego se enfrió y agregó 0,2 mL de DTNB 1,5 mg/mL en buffer fosfato de potasio 0,5 mol/L pH 6,8. Transcurrido los 5 minutos se determinó la absorbancia a 412 nm.

Los resultados fueron expresados en nmol/g de tejido, el cual fue determinado mediante la siguiente fórmula:

$$[GSH^{nmol/g \text{ tejido}}] = \frac{nmol_{St} \times Abs_{MP} \times Vt}{Abs_{St} \times VR \times W}$$

VR = Volumen real del homogenizado (0,19 mL).

W = gramos de tejido en 100 mL de homogenizado (aproximadamente 10%w/v).

Vt = Volumen total del tubo de reacción (1,4 mL).

### 3.4.9.2.3 Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La técnica ejecutada corresponde a Buege y Aust (1978)

**Fundamento:** El malondialdehído, uno de los productos de peroxidación lipídica, reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico, dando un color rosado, con una absorción máxima a los 532 - 535 nm.

Se utilizó el homogenizado de estómago preparado en **3.4.8**, se le agregó TCA al 20% para desproteinizar.

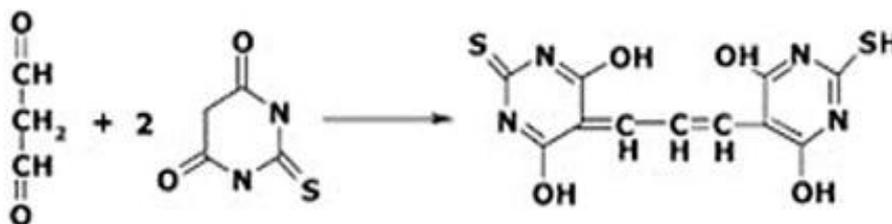


Figura 9.- **Formación del complejo malondialdehído.** Fuente. Tomado de Analytical Methods for Resolving Data de TBA<sub>2</sub>-MDA..

**Procedimiento:**

Se utilizó el siguiente protocolo:

**Cuadro 4.- Determinación de Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

	Blanco	Grupo I	Grupo II	Grupo IV	Grupo V
mL Buffer fosfato de potasio 0,01 mol/L pH 7,4	0,3	--	--	--	--
mL Homogenizado	--	0,3	0,3	0,3	0,3
mL TCA 20%	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Baño María hirviendo por 15 minutos, enfriar en agua helada					
TBA 0,67%/ HCl 0,25 N	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Baño María hirviendo por 30 minutos, enfriar en agua helada. Centrifugar a 6 000 rpm por 10'					

Se separó el sobrenadante, luego fue leído a 535 nm.

Los cálculos de concentración de TBARS en homogenizado se determinaron mediante la fórmula:

$$\text{Absorbancia} = \epsilon \cdot l \cdot c \qquad c = \text{Abs} / \epsilon \times l$$

Los resultados fueron expresado en nmol/g de tejido y determinado mediante la siguiente formula:

$$[TBARS^{nmol/g \text{ tejido}}] = \frac{Abs_{MP} \times Vt}{\epsilon \times l \times W} \times Fd$$

$\epsilon$  =  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (coeficiente de extinción molar)

$l$  = 1 cm (ancho de la cubeta)

$c$  = concentración de TBARS en nmol/mL.

$W$  = peso de tejido en gramos en 100 mL de homogenizado

$VT$  = Volumen total del homogenizado

$Fd$  = Factor de dilución (6)

### 3.4.9.3 Determinación de proteínas:

Se aplicó el método de Lowry (1951)

**Fundamento:** En medio alcalino los iones de  $\text{Cu}^{+2}$  forman complejos de coordinación con los enlaces peptídicos en presencia de tartrato de sodio para evitar la precipitación. El reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotungstico) o reactivo de fenoles, se reduce por la presencia del grupo fenol de la tirosina y en menor medida del imidazol e indol del triptófano dando lugar a un color azul intenso. El complejo coloreado se lee a 700 nm.

**Procedimiento:** El sobrenadante del homogenizado se diluyó 1/10 y se precedió según procedimiento del Cuadro N° 5.

*Cuadro 5.- Determinación de proteínas en homogenizado gástrico*

	Blanco	St	MP
mL Tampón alcalino	1	1	1
mL de homogenizado 1/10	--	--	0,1
mL solución estándar 2 mg/mL	--	0,1	--
mL reactivo cúprico	0,4	0,4	0,4
Dejar reposar por 5 minutos a temperatura ambiente			
mL Folin-Ciocalteu 1/3	0,75	0,75	0,75
Reposar por 10 minutos y leer a 700nm			

### 3.4.10 Ensayo de toxicidad aguda

Se determinó la toxicidad aguda, por el método a dosis límite (2 000 mg/kg), del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray "matico serrano" en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/c por vía oral.

Se utilizaron 20 ratones (10 machos y 10 hembras), los cuales fueron distribuidos proporcionalmente y de manera aleatoria en dos grupos: control (5 machos y 5 hembras) y extracto (5 machos y 5 hembras), siendo

mantenidos en un ambiente con temperatura controlada (aproximadamente 20°C) con 12 horas de luz natural y 12 de oscuridad.

Fueron sometidos a un ayuno de 12 horas, el grupo control recibió solución salina (0,9% NaCl) 0,5 mL/10 g de animal, y el grupo experimental recibió el extracto hidroalcohólico a la dosis de 2 000 mg/kg en una sola dosis, según la técnica de dosis fija o dosis límite de la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) 2001.

Los ratones se mantuvieron en observación cada tres horas en el primer día, luego se observó cada doce horas hasta el día 14 post administración.

El peso fue controlado al inicio, siete y catorce días.

Concluido el tiempo los animales fueron sacrificado por decapitación, luego se extrajeron los órganos vitales como: hígado y riñones para su evaluación macroscópica.

#### **3.4.11 Análisis estadísticos**

Al no presentar los resultados una distribución normal, se aplicó la prueba Kruskal-Wallis, para comparar medias de más de dos grupos, y la prueba Mann-Whitney, para comparar medias de dos grupos. Se utilizó el valor  $p < 0,05$  y  $0,01$  para la consideración de diferencia estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 16.

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Presentación de Resultados

#### 4.1.1 Marcha fitoquímica

Los resultados para la determinación semicuantitativa de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico se muestran en el Cuadro N°6

*Cuadro 6.- Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de Jungia paniculata (DC.) A. Gray “matico serrano”*

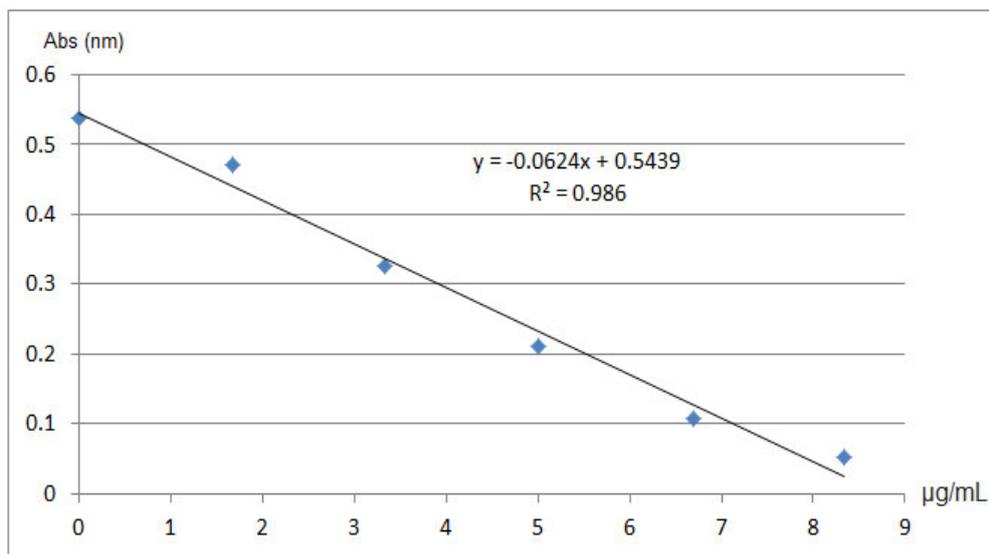
Reactivo	Metabolitos primarios y secundarios	Resultados
Molisch	Carbohidratos	++
Ninhidrina 1%	Aminoácidos	++
Shinoda	<b>Flavonoides</b>	<b>+++</b>
FeCl <sub>3</sub> 1%	<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>+++</b>
Liebermann – Burchard	Esteroides	++
Borotrager	Antraquinonas	-
Mayer	Alcaloides	-
Dragendorff	Alcaloides	-
Reacción de la espuma	Saponinas	-
Vainillín sulfúrico	Heterósidos	+++
Gelatina 1%	<b>Taninos hidrolizables</b>	<b>+++</b>
Agua de bromo	Taninos condensados	+

En los resultados se observa una mayor presencia de compuestos fenólicos entre ellos los flavonoides y los taninos hidrolizables.

#### 4.1.2 Actividad antirradical libre

Las absorbancias obtenidas empleando el radical libre DPPH frente al extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” muestran una curva notoriamente descendiente y un R<sup>2</sup> con un valor cercano a la unidad, (Figura 8). Este resultado es comparable con los obtenidos con las sustancias antioxidantes de referencia, Vitamina C

(Anexo 2) y Trolox (Anexo 3). Es importante tomar en cuenta que la muestra de *Jungia paniculata* es un extracto hidroalcohólico y los estándares son sustancias puras.



**Figura 10.- Curva de reducción del DPPH por el extracto etanólico de hojas de *Jungia paniculata*.**

El porcentaje de captación del radical DPPH que se ha obtenido con el extracto de *Jungia paniculata* equivale al 70,5 % del porcentaje de captación que tiene la vitamina C frente a este radical libre, y de 51,7% del porcentaje de captación que muestra el trolox.

Se observa un valor más cercano al trolox, esto puede corroborarse con los valores expresados en capacidad antioxidante equivalente, la capacidad antioxidante equivalente a vitamina C (VCEAC) es 552 µg Vit C / mg de extracto seco de *Jungia paniculata* y la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC) es de 814 µg de Trolox / mg de extracto seco de *Jungia paniculata*.

**Cuadro 7.- Resultados de IC<sub>50</sub> y % captación de DPPH, de Vitamina C, Trolox y *Jungia paniculata*.**

	IC <sub>50</sub> µg/mL	* % Captación
Jungia paniculata	4,15 ± 0,035	41,1
Vitamina C	2,29 ± 0,042	76,5
Trolox	3,38 ± 0,042	51,7

\*A la concentración de 3,5 µg/mL

Sobre los resultados de IC<sub>50</sub> (cuadro N° 7) puede observarse que los tres datos obtenidos comparten las mismas unidades de concentración y los valores no son lejanos teniendo en cuenta que el extracto es una mezcla de sustancias con y sin actividad antioxidante.

#### **4.1.3 Evaluación macroscópica de la mucosa gástrica:**

Grupo I: Color de la mucosa normal, pliegues conservados, color de la mucosa normal (rosado), no hay presencia de petequias, edema o pérdida de moco

Grupo II: Color de la mucosa hiperémica, con pérdida de pliegues, edema moderado y fuerte hemorragia. Fuerte pérdida de moco, lesiones necro hemorrágicas de hasta 1 mm. Según la escala se considera daño fuerte.

Grupo III: Coloración de la mucosa hiperémica, pliegues conservados, leve presencia de edema, no hay hemorragia, leve desprendimiento de moco. Daño moderado.

Grupo IV: Coloración de la mucosa normal, no hay pérdida de pliegues, ni edema, ni pérdida de moco. Daño moderado.

#### **4.1.4 Indicadores bioquímicos antioxidante con actividad enzimática**

##### **4.1.4.1 Actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD).**

La inducción gástrica con etanol al 70% produjo una disminución significativa de la actividad específica de la superóxido dismutasa

(SOD) en el grupo II comparado con el grupo I ( $p < 0,05$ ), tal como se muestra en el Cuadro 8

Los grupos III y IV presentaron un incremento significativo de la actividad específica de la SOD comparados con el grupo II ( $p < 0,05$ ) y ( $p < 0,02$ ) respectivamente.

#### **4.1.4.2 Actividad específica de la catalasa (CAT).**

Los resultados obtenidos con respecto a la actividad específica de la catalasa, no presentaron una variación significativa entre los grupos experimentales.

La relación SOD/Catalasa es menor en el grupo tratado con el agente injurioso en comparación con los demás grupos.

**Cuadro 8.- Resultado de las enzimas antioxidantes SOD y Catalasa en homogenizado de estómago de ratas sometidas a injuria con etanol al 70%**

Grupos	Superoxido dismutasa U/mg proteína	Catalasa $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína	SOD/Catalasa
Grupo I	25,08 $\pm$ 5,44 <sup>(a)</sup>	13,81 $\pm$ 2,68	1,82
Grupo II	16,42 $\pm$ 1,40	14,49 $\pm$ 1,62	1,13
Grupo III	20,63 $\pm$ 2,65 <sup>(a)</sup>	13,32 $\pm$ 1,51	1,56
Grupo IV	23,23 $\pm$ 2,95 <sup>(b)</sup>	13,21 $\pm$ 0,87	1,74

(a)  $p < 0,05$  comparado con el grupo II

(b)  $p < 0,02$  comparado con el grupo II

#### **4.1.5 Indicadores bioquímicos de estrés oxidativo**

**4.1.5.1 Niveles de Glutación reducido y total.** Se observó una menor concentración de GSH reducido en el grupo II con respecto al grupo I, III y IV (Cuadro N° 9). Siendo significativo con el grupo I ( $p < 0,05$ ) y con el grupo IV ( $p < 0,01$ ).

Los grupos que recibieron el extracto (III y IV) presentaron una menor concentración de GSH oxidado en comparación al grupo que recibió solo etanol (II).

**4.1.5.2 Niveles de especie reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).** Los resultados en el Cuadro N° 9 nos muestran un ligero incremento de TBARS cuando es inducido con etanol (grupo II) con respecto a un estado basal (grupo I).

Los grupos que fueron tratados con el extracto (III y IV) presentaron una disminución de los niveles de TBARS en comparación al grupo II, ( $p < 0,05$ ) y ( $p < 0,02$ ) respectivamente.

**Cuadro 9.- Resultado de los indicadores de estrés oxidativo en homogenizado de estómago de ratas sometidas a injuria con etanol al 70%**

Grupos	Glutation x 10 <sup>2</sup> nmol/g Tej.			Red/oxid	TBARS nmol/g tej
	Total	Reducido	Oxidado		
Grupo I	13,07±1,67	12,63±1,57 <sup>b</sup>	0,44	29,44 <sup>a</sup>	4,13 ±1,30
Grupo II	12,39 ±1,47	9,54 ±0,82	2,86	3,87	4,92 ±0,83
Grupo III	12,22 ±2,81	11,54 ±2,60	0,68	17,52 <sup>a</sup>	3,38 ±0,50 <sup>b</sup>
Grupo IV	14,99 ±1,40 <sup>b</sup>	14,43 ±1,38 <sup>a</sup>	0,57	25,70 <sup>a</sup>	3,22 ±0,56 <sup>b</sup>

(a)  $p < 0,01$  comparado con el grupo II

(b)  $p < 0,05$  comparado con el grupo II

#### **4.1.6 Toxicidad Aguda**

Teniendo en consideración lo descrito en la metodología, la administración de una dosis límite de 2 000 mg/kg de masa corporal no provocó muerte en los ratones o síntomas indicativos de toxicidad. (OECD, 2001)

Siempre se observó una conducta normal en los animales: reflejo postural normal, hábitos de aseo y respuesta habitual a los estímulos nociceptivos, así como consumo de alimentos y agua como corresponde a su especie.

Los estudios anatómo patológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos blanco (hígado, pulmón, riñón).

## **4.2 Discusión de resultados.**

### **4.2.1 De las pruebas analíticas del extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata***

El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico al 70% de hojas de *Jungia paniculata* recolectada de la Región del Nor Yauyos, reportó la presencia de metabolitos bioactivos principalmente los polifenoles (ver Cuadro 6), encontrándose dentro de este grupo mayor presencia de flavonoides y taninos hidrolizables, además de heterósidos.

Casado et al., (2007), también reportaron en estudios realizados de *Jungia paniculata* recolectada en la Región Nor-Yauyos, presencia de flavonoides, específicamente dos flavonas (luteolina, apigenina), sus derivados (7-glucosil-apigenina, 7-glucosil-luteolina) y ácidos fenólicos tanto en el extracto etanólico 50% como en los extractos metanólico y acuoso de las hojas.

A su vez Paredes (1990) sobre la misma especie botánica recolectada en San Pedro de Casta, provincia de Huarochirí del Departamento de Lima, informó presencia de taninos y saponinas tanto en el extracto acuoso como en el extracto etanólico.

Ambos estudios concuerdan con nuestro hallazgo, es decir mayor presencia de los compuestos polifenólicos (flavonoides y taninos).

El estudio *in vitro* de la capacidad antioxidante realizada en este estudio revela que el extracto de *Jungia paniculata* en términos de captura del radical libre DPPH presenta una IC<sub>50</sub> de 4,15 µg/mL (Cuadro 3) valor que se puede considerar de alta actividad antioxidante si lo comparamos con la

IC<sub>50</sub> de vitamina C (2,29 µg/mL) y de Trolox (3,38 µg/mL) teniendo en cuenta que las sustancias de referencia son compuestos puros y la muestra ensayada es un extracto, la cual es una mezcla de metabolitos secundarios con y sin actividad antioxidante. Esta capacidad atrapadora de radicales libres, podría atribuirse a la presencia de los compuestos fenólicos hallados durante la marcha fitoquímica.

Estudios de IC<sub>50</sub> analizados frente al radical libre DPPH, reportados en la literatura también con solventes polares como el de Sreenivasan et al., (2007) sobre el extracto metanólico al 80% de *Gracilaria changii* presentó un IC<sub>50</sub> de 14,70 mg/mL y otro estudio de Sandoval et al., (2000) reportaron que los extractos acuosos de la corteza de *Uncaria tomentosa* y de *Uncaria guianensis* presentaron un IC<sub>50</sub> de 21,7 µg/mL y 13,6 µg/mL respectivamente, y la actividad antioxidante de flavonoides aislados de la *Opuntia ficus* por Dok et al., (2002) presentó un IC<sub>50</sub> de 10,37 µg/mL para quercetina, 14,34 µg/mL para dihidróxi-quercetina y 14,62 µg/mL para quercetina-3-metil éter.

Estos resultados expresados en función al valor de la IC<sub>50</sub> comparados con el menor valor de IC<sub>50</sub> del extracto de *Jungia paniculata* permite proponer que el contenido de los metabolitos secundarios de esta planta tienen mejor comportamiento antioxidante que los mencionados, cuando son enfrentados al radical DPPH.

Ramos et al., (2008) evaluaron la capacidad antioxidante de varias plantas medicinales peruanas con el radical estable DPPH e informaron que el extracto metanólico de hojas (50 µg/mL) de *Calophyllum brasiliense* presentó un porcentaje de captación del radical libre de 99,76%, *Minthostachys mollis* (hojas de muña) extracto acuoso a 50 µg/mL de 92,41%, *Alchornea castaneifolia* (hiporuro) extracto metanólico a 50 µg/mL de 75,96%. El porcentaje de captación del radical libre del extracto de *Jungia paniculata* es de 95,0% a una concentración de 8,2 µg/mL (ver Cuadro 7), valor mucho menor que los mostrados por Ramos et al.

Ameer et al., (2015) reportaron los valores de VCEAC (mg Vit C/ g de extracto seco) de tres plantas medicinales: *Aizoon canariense* L., *Asphodelus tenuifolius* Cav., y *Emex spinosus* (L.) 0,068, 0,25 y 0,44 respectivamente, en el presente estudio se halló un VCEAC de 552 mg/g ext. seco. Dae et al., (2002) expresaron la capacidad antioxidante de varias plantas alimenticias entre ellas la manzana Gala con un VCEAC de  $1,36 \pm 0,06$  mg/g,

En relación al TEAC ( $\mu\text{mol/g}$ ) Beserra et al., (2011) es un estudio sobre frutos del noreste del Brasil reportaron para *Carica papaya* L. 2,24, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth 6,46, *Spondias purpurea* L.1,50. Comparado con el TEAC de *Jungia paniculata* de  $3,25 \mu\text{mol/g}$  sólo es superado por *Byrsonima crassifolia*, el cual presenta una elevada composición de compuestos polifenólicos.

El extracto hidroalcohólico del matico serrano presenta entonces un elevado potencial de la capacidad atrapadora de radicales libres *in vitro*, esto permite proponer a la *Jungia paniculata* como una planta promisoría en la prevención de diversas patologías relacionadas con el estrés oxidativo, probablemente por su contenido en polifenoles.

#### **4.2.2 De los resultados del ensayo experimental**

Los indicadores bioquímicos que se estudiaron en el modelo experimental muestran que los metabolitos secundarios con elevado potencial antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata* ejercerían actividad *in vivo*.

El tratamiento previo con extractos de plantas medicinales, protege frente al agente lesionante, ya sea directamente, neutralizando los radicales libres generados en un proceso inflamatorio, como también la modulación del estado redox por aumentos en el potencial de defensa antioxidante endógeno, incrementando probablemente la actividad de ciertas enzimas antioxidantes como SOD y CAT.(González et al., 2007).

En el presente estudio se encontró que la inducción a úlcera con etanol al 70%, en el grupo II, redujo la actividad de la SOD de forma significativa ( $p < 0,05$ ), comparado con el grupo I. (ver Cuadro 8). Sin embargo la actividad de la catalasa no mostró cambios significativos. Este hallazgo es corroborado por Aderibigbe et al., (2011), Álvarez et al., (2011) y Arafa et al., (2003), quienes reportaron una disminución de SOD e incremento no significativo de la catalasa.

En caso de una disminución en la actividad de CAT o de glutathion peroxidasa, el daño potencial se incrementa debido a la relativa estabilidad del peróxido de hidrógeno y a su capacidad de movilizarse en el medio pudiendo alcanzar o atravesar membranas.

En este estudio, el grupo III ha mostrado actividad específica de la SOD significativamente mayor al grupo II ( $p < 0,05$ ), evidenciando el efecto protector o estimulante del extracto hidroalcohólico frente al daño agudo inducido por el etanol. También en el mismo Cuadro 8, es de notar que el extracto IV no induce reacciones prooxidantes en el tejido gástrico, considerando que algunos metabolitos secundarios pueden ejercer la actividad dual antioxidante-prooxidante.

La presencia de los polifenoles (flavonoides) en el grupo III explicaría el aumento de la actividad de la SOD ya que estas no solo retiran aniones superóxido sino radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. (Martínez et al., 2002).

Estos resultados encontrados en la SOD pueden estar relacionados con el efecto protector encontrados en los otros indicadores como los niveles de GSH y TBARS que se muestran en el cuadro 9 y corroborado por lo reportado por Pires et al., (2013).

Se ha podido demostrar experimentalmente que la actividad de la CAT no se modifica en ningunos de los grupos (ver Cuadro 8), lo cual puede explicarse por el elevado  $K_m$  de esta enzima 2,75 mM o por la participación de la glutathion peroxidasa, ( $K_m$  1,0  $\mu$ M) enzima que cataliza

la misma reacción sobre el peróxido de hidrógeno teniendo como co-sustrato al glutatión. Esta enzima ejerce su efecto bajo condiciones donde el NADPH sea un factor limitante o cuando los niveles de  $H_2O_2$  están particularmente elevados.

Con respecto al modelo experimental de injuria con etanol, los parámetros bioquímicos analizados en relación a los niveles de GSH reducido en los grupos de tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Jungia paniculata* vía peroral (ver Cuadro 9) se observa en el grupo III, que el extracto ha contribuido con la recuperación del glutatión reducido pues la relación red/ox en este grupo es significativamente más elevado que el grupo injuriado.

Este resultado revela que el extracto promueve el incremento de GSH como otro mecanismo protector frente al daño gástrico generado por etanol condición en el que se eleva la concentración de radicales libres (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) que puede llevar a la lipoperoxidación y daño oxidativo, tal como lo menciona Hiraishi et al., (1999).

Martínez (2005) y Myhrtad (2002), señalan que sería la inducción de la síntesis de GSH y la interrupción de la reacción en cadena de la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados los mecanismos involucrados y evitando así la generación de otras radicales lipoperóxidos. El GSH además de su papel de cofactor en reacciones enzimáticas también tiene la capacidad de capturar radicales libres y participar en la detoxificación.

En esta situación de injuria alcohólica, el etanol pasa por el sistema de detoxificación microsomal a través de la fase I mediante el sistema CYP450 2E1 el cual consume  $NADPH+H^+$  proveniente principalmente de la vía de las pentosas, esta misma coenzima también es requerida para reducir el GSSG a GSH.

Lo que significa que se está generando ROS y estaría evitando la recuperación del GSH a través del sistema del glutatión mediada por la

GSH reductasa. Este ciclo de recuperación disminuido, se refleja en la relación GSH/GSSG, del grupo intoxicado con etanol (Grupo II) y una mayor relación en el grupo tratado con el extracto de *Jungia paniculata*, probablemente por la presencia de los metabolitos secundarios que estimularían la síntesis del GSH. (ver Cuadro 9).

Esta situación de estrés oxidativo podría explicar el daño a la mucosa gástrica observado macroscópicamente en los estómagos del grupo II: erosiones, sangrado sub epitelial, pérdida de moco gástrico, lo cual no fue observado en los otros grupos.

Dicho hallazgo tanto bioquímico como anatómico puede explicarse por la presencia de los metabolitos secundarios identificados en la marcha fitoquímica (ver Cuadro 6), destacando los polifenoles y dentro de ellos a los flavonoides, los cuales tienen un elevado potencial antioxidante al reducir a los radicales libres especialmente anión superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos e hidroperóxidos; además los flavonoides son importantes para el control de las concentraciones intracelulares del glutatión tal como se observa en un estudio donde la presencia de flavonoide induce la actividad de gamma glutamilcisteina sintetasa. (Myhrtad et al., 2002).

Szabo et al., (1981) encontraron que los compuestos que tienen grupo sulfhidrilos protegen al estómago de erosiones y hemorragia dosis-dependiente, y pueden intervenir en la inducción de prostaglandinas citoprotectoras.

Arafa (2003) y Kanter (2005), reportaron hallazgos similares, al emplear etanol como agente inductor de úlcera gástrica. En el grupo inducido, los niveles de GSH disminuyeron en comparación a sus respectivo grupo control, ( $p < 0,05$ ). Kumar (2009) reportó que el extracto etanólico de corteza de *Pterospermum acerifolium* dosis de 150 mg/kg más etanol, disminuyó en un 66,4% de los niveles de GSH, mientras que el grupo que recibió 300 mg/kg más etanol solo se redujo un 23,7% del contenido de GSH, esto nos indica que frente a la generación de radicales libres por

etanol los niveles de GSH tienden a disminuir, y que la presencia de sustancias antioxidantes exógenas estaría atenuando esta disminución del GSH.

El estudio de los TBARS es otro indicador de estrés oxidativo principalmente a nivel de las membranas biológicas, ya que son sus ácidos grasos poliinsaturados los que son agredidos por acción de los ROS endógenos y exógenos provocados por el etanol, como consecuencia hay una disrupción de la membrana, cambios en su fluidez y permeabilidad y finalmente lisis.

En esta investigación se ha hallado que los grupos tratados con el extracto de *Jungia paniculata* (III y IV) presentaron una menor concentración de indicadores de lipoperoxidación (MDA) en comparación del grupo II, ( $p < 0,05$ ), esto sugiere que los principios activos de la planta estarían ejerciendo protección a las membranas biológicas en contra del ataque de los radicales libres ( $O\cdot^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$ ) los cuales provocan daño oxidativo conocido como peroxidación lipídica. (ver Cuadro 9)

El etanol no solo causa daño directo sobre la membrana celular por lipoperoxidación, sino también genera un aumento de la permeabilidad transitoria y despolarización mitocondrial, el cual precede a la muerte celular en la célula de la mucosa gástrica (Hirokawa et al., 1998), incrementando la producción del anión superóxido e hidroxilo en la mucosa gástrica (Bagchi et al., 1998), estas especies reactivas inducirán a la lipoperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas.

Además es importante resaltar que los grupos tratados con el extracto (III y IV) presentan menor concentración de TBARS comparado con el grupo I, estos resultados nos estarían indicando que probablemente los componentes polifenólicos del extracto ejercerían un efecto protector de las membranas biológicas en condiciones fisiológicas y en condiciones de estrés oxidativo, como secuestrantes de especies reactivas del oxígeno ( $O_2\cdot^-$ , oxígeno singlete, radicales lipoperóxilo) (Martínez et al., 2002).

Debe recordarse que la lipoperoxidación mediada por las ROS es causa importante de la destrucción y el daño de las membranas celulares, estando esto relacionado con la patogenia de la injuria aguda gástrica, inducida no solo por etanol sino también por otras sustancias como la indometacina, tal como lo reporta Bagchi et al., (1998) y

En cuanto a los resultados de la toxicidad aguda a una dosis límite de 2 000 mg/kg, no presentó efectos adversos durante los 14 días que duró el experimento, permiten indicar que la  $DL_{50}$  es mayor de la dosis límite experimentada y está refrendada al no registrarse muerte alguna después de los 14 días de observación. Similar resultado se halló en otra especie *Paederia foetida* de la familia de las Rubiáceas a la misma dosis de 2 000 mg/kg, es decir sin pérdida de peso, diarrea o depresión. Chanda et al., (2011)

La búsqueda de nuevos fármacos de origen natural o la aplicación de una nueva tecnología, lleva implícito la realización de una serie de investigaciones previas que incluyen los estudios toxicológicos, con la finalidad de determinar la seguridad de su uso.

## CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* contribuye a la recuperación de la actividad enzimática de la SOD, en el modelo de daño gástrico inducido por etanol. Y se refleja en la relación SOD/CAT
2. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” ejerce gastroprotección in vivo frente a indicadores de estrés oxidativo, disminuyendo la lipoperoxidación, incrementando los niveles de GSH reducido
3. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (DC.) A. Gray “matico serrano” no presentó efecto adverso a la dosis de 2 000 mg/kg.

## RECOMENDACIONES

1. Determinar la actividad de la glutatión peroxidasa en tejido gástrico.
2. Determinar la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en tejido gástrico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aderibigbe, O., Odetola, A., Oluwole, F. et al., (2011). Antioxidant properties of methanol extract of *Parquetina nigrescens* in ulcerated rats. *International Journal of Tropical Medicine* 6(2); 25-29.
2. Aebi, H.(1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*; 105: 126-6.
3. Allen, A., Flemström, G., Garner, A. y Kivilaakso, E. (1993) Gastroduodenal mucosal protection. *Physiol Rev Oct*; 73 (4):823-57.
4. Alvarez, J., Dekanski, D., Ristic, S. et al., (2011). Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PloS one*; 6(10) e25878. doi:10.1371/journal.pone.0025878.
5. Ameer, A., Alkhuzai, J. y Freije, A. (2015) Assessment of antioxidant activities of three wild medicinal plants from Bahrain. Department of Biology, College of Science, University of Bahrain, Sakhir Campus, P.O. Box 32038, Bahrain. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.03.004>.
6. Arafa, H., Sayed, M. (2003) Protective role of carnitine esters against alcohol-induced gastric lesions in rats. *Pharmacological Research*;48;285-90.
7. Atuma, Ch. (2000) Gastrointestinal mucosal protective mechanisms. (tesis de doctorado). Uppsala University – Suecia.
8. Avello, M. y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, Estrés oxidativo y defensa antioxidante celular. Proyectos FONDECYT (020476). Universidad de Concepción.
9. Bagchi, D., Carryl, O., Tran, M. y col. (1998) Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Journal of applied Toxicology*, 18 (Suppl 1).3-13.

10. Béjar E. y Suárez S. 2007. Antioxidant and gastroprotective *in vitro* properties of *Jungia paniculata* DC Gray "Matico Serrano". International Conference of Oxidative Stress HAVANA-REDOX.
11. Bhattacharya A., Chattiopathyay R., Mitra S y Crowe S. (2014) Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev.* Apr 94(2): 239-354.
12. Bhattacharya S. (2015) Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. *Free Radicals in Human Health and Disease*.
13. Beserra, M., Machado, P., Campos, A., Matias, G., De Carvalho, C., Arraes, G. y Gomes, T. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*; Volume 44, Issue 7, Pages 2155–2159.
14. Boyne, A. F. y Ellman, G. L. (1972). Assay for glutathione. *Anal Biochem*; 46; 639-53.
15. Buege, J. A. y Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, 52;302-6.
16. Casado, R., Landa, A. y Calvo, M.I. (2007) Actividad antioxidante de *Jungia paniculata* (Asterácea) y sus flavonoides. 4º Congreso de Fitoterapia de la SEFIT (Sociedad Española de Fitoterapia. Facultad de Farmacia de Sevilla, 19-21 octubre.
17. Céspedes, E., Hernández, I. y Llópiz, J. (1996) Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II Catalasa. *Rev Cubana Invest Biomed* 15(2).
18. Chanda S., Deb L., Kumar R., Singh K. y Ahmad S. (2015). Gastroprotective mechanism of *Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae) – a popular edible plant used by the tribal community of North-East India. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15: 304.

19. CYTED - Manual de Técnicas de Investigación (1995) Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
20. CYTED Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (2001). RIVAPLAMED.- Red de validación de Plantas Medicinales. Métodos farmacológicos para la validación de plantas medicinales.
21. Dae, K., Ki, L., Hyong, L., y Chang, L. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. J Agric Food Chem. Jun 19;50(13):3713-7.
22. De Leve, L., Kaplowitz, N. (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 52: 287-305.
23. Dell'Agli M., Busciala A. y Bosisio E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research* 63 593–602.
24. Díaz, E. y Membrillo, J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1):34-44.
25. Dirección de Salud IV Lima Este – Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental. (2009) Prevalencia de Estrés laboral en trabajadores asistenciales de la dirección de la salud IV LE.
26. Dok, H., Heun, K., Ja, H. y col (2002) Neuroprotective effects of antioxidative flavonoides, quercetina, (+)-dihydroquercetin and quercetina 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus - indica* var. *saboten*. *Brain Research* 965; 130-136.
27. Enciso E. y Arroyo J. (2011) Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An. Fac. med.* v.72 n.4.

28. Foy Valencia E. ( 2012 ) Plantas autóctonas del Perú: sus aplicaciones en la medicina tradicional. Recuperado de <http://peru.inka.free.fr/peru/pdf/medicina.pdf>.
29. García, B., García, O., Clapes, S. y col. (1995). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxidodismutasa. *Rev Cubana Invest Bioméd* ;14 (2).
30. González F., Sánchez S. y Tuñón M. (2007) Revisión Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp.*;22(3):287-93.
31. Hiraishi, H., Shimada, T., Ivey, K. y Terano A. (1999) Role of antioxidant defenses against ethanol-induced damage in cultured rat gastric epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* Apr;289(1):103-9.
32. Huamán, O., Béjar, E., Suárez, S. y Soriano, Y. (2006) Efecto antioxidante en la mucosa gástrica frente a la injuria del etanol al 75% y actividad antirradical libre in vitro del extracto acuoso de hojas de *Jungia paniculata*. *An Fac Med Lima*; 67 Supp 1-S25.
33. Huamán, O., Béjar, E., y Calderón, S. (2006) Estudio histopatológico del extracto acuoso de hojas de *Jungia paniculata* (matico serrano), en úlceras inducidas en estómago de ratas con etanol 75%. *AnFacMed Lima*; 67 Supp 1-S28.
34. Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., y Montier, F. (1995). Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Medica*, 61, 126-129.
35. Joyeux M., Mortier, F., Fleurentin J. (1995). *Phytother. Res.* 9 228.
36. *Jungia paniculata*. Iconografía Mutisiana: 1162 Real Jard. Bot., Madrid Español A De Cooperación Internacional Instituto Colombiano de Antropología e Historia.

37. Kalia, N., Brown, J., Jacob, S., Reed, M. y Bardhan, K. (1997). Studies on gastric mucosal microcirculation, The nature of regional variations induced by ethanol injury. *Gut*; 40:31-35.
38. Kanter, M., Demir, H., Karakaya, C. y Ozbek, H. (2005) Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol*;11(42) 6662-66.
39. Kumar, A., Jena J., Kumar A. y col (2009) Effect of *Pterospermum acerifolium* bark extract on oxidative damages in the gastric tissue during alcohol induced ulceration. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol.1, Suppl 1.
40. Kumar S. y Vasudevan D.M. (2007) Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences* 81: 177 – 187.
41. Laboratorio de Farmacognosia Instituto Rural Valle Grande Cañete (2002). Manual de Uso de Plantas Medicinales del Nor-Yauyos. 1-18. Perú.
42. Lock de Ugaz, O. (1993) Investigación fitoquímica - Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición. Lima-Perú.
43. Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
44. Marklund, S. y Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Biochem*, 47;469-74.
45. Martínez Sánchez, G. (2005) Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cubana Farm*, 39(3):100-8.
46. Martínez, J., Gonzáles, J., Culebras, M. y Tuñón M<sup>a</sup>. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr.Hosp.* XVII(6)271-8.

47. Monografías de Plantas Medicinales - Portal Instituto Nacional de Salud. Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/portal/jerarquia/7/109/monografias-de-plantas-medicinales/jer.109>.
48. Morante, M. (2004). Estudio del estrés oxidativo hepático en un modelo in vivo de deficiencia en Vitamina E. Papel de NF- $\kappa$ B en la regulación de los genes de la  $\gamma$ -glutamyl cisteína sintetasa y genes implicados en el control del ciclo celular. Tesis doctoral- Universidad de Valencia.
49. Myhrstad, M., Carlsen H, Nordstrom O, Blomhoff R y MoskaugJ. (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med*,32:386-393.
50. OECD (2001) Principle of the main test - Guideline for testing of chemicals. <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
51. Oficina General de Estadística e Informática. Principales causas de morbilidad registrada en consulta externa - Año 2004- 2014. Ministerio de Salud del Perú.
52. OMS (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>.
53. Orrenius S., Zhivotovsky B. y Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium - apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*: 4(7):552-65.
54. Paredes Linares, Oscar (1990) Estudio fitoquímico de *Jungia paniculata* (DC) Gray "Ckaramati" "Matico Serrano". Tesis de Aptitud profesional para optar el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
55. Pires G., Rodríguez N., Pillon R., Dobrachinski F., Portella R., et al. (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food and Chemical Toxicology*

55:48–55.

56. Ramos, E., Castañeda, B. y Ibañez, L. (2008) Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Perú Salud* 15 (1) 42-46.
57. Rehecho, S., Uriarte, I. y col. (2011) Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Perú. *Journal of Ethnopharmacology* 133;75-85.
58. Repetto, M.,G. y Llesuy, S.,F. (2002) Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz J med Biol Res* 35; 523-34.
59. Sandoval, M., Charbonnet R., Okuhama N. y col (2000). Cat's claw inhibits TNF $\alpha$  production and scavenges free radical: role in cytoprotection. *Free Radical Biology & Medicine*;29(1) 71-78.
60. San Miguel, A. y Martin, G. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y antioxidantes en clínica. Servicio de análisis clínicos Hospital Río Ortega. Valladolid.
62. Shorrock, C. y Rees, W. (1988) Overview of gastroduodenal mucosal protection. *Am J. Med*, Feb 22;84(2A):25-34.
63. Sies H. y Stahl W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 1995 Dec;62(6 Suppl):1315S-1321S.
64. Sreenivasan, S., Ibrahim, D. y Mohd, M. (2007) Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *Gracilaria chagii*. *Internacional Journal of Natural and Engineering Sciencies* 1 (3) 115-117.
65. Szabo et al (1981). Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. *Science* 09 Oct 1981: Vol. 214, Issue 4517, pp. 200-202.

66. Tornawski, A. (1995) Mecanismos celulares y moleculares de la mucosa gástrica: La injuria a la mucosa y la acción protectora de los antiácidos. *Rev. gastroenterol. Perú*15, (1), 74-80. ISSN versión electrónica 1609-722X.
67. Turrens, J. (1994) Fuentes intracelulares de especies oxidativas en condiciones normales y patológicas. *Antioxidantes y Calidad de Vida*; 1:16-9.
68. Venereo, J. (2002) Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana MedMilt.*, 31(2): 126-33.
69. Valdivia Roldán, Mario (2011) Gastritis y Gastropatías. *Rev. Gastroenterol, Perú*; 2011;31-1: 38-48.
70. Valko A., Rhodes C.J., Moncola M., Izacovich M. y Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 16: 1–40.
71. Wilches, I., Tobar, T., Peñaherrera, E., Cuzco, N., Jerves, L., Leòn F. y Vila, E. (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of the methanolic extract from *Jungia rugosa* leaves in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 173:166 – 171.
72. Yoshikawa T., Ueda S., Naito Y. et al (1989). Role of oxygen-derived free radicals in gastric mucosal injury induced by ischemia or ischemia reperfusion in rats. *Free Radical Research Communications*, 7: 285- 291.
73. Zacaria, Z., Balan T., Khusairi, A., Hasyima, M., Mohtarrudin, N., et al (2016). Mechanism(s) of action underlying the gastroprotective effect of ethyl acetate fraction obtained from the crude methanolic leaves extract of *Muntingia calabura*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16:78 DOI 10.1186/s12906-016-1041-0
74. Zorofchian, S., Moghadamtousi, A., Rouhollahi, E., Karimian, H., Fadaeinasab, M., Abdul H., y Ameen, A. (2014). Glutamine treatment attenuates hyperglycemia-induced mitochondrial stress. *Drug Design, Development and Therapy*:8 2099–2110.

75. Zorrilla, A., Izquierdo M., Expósito M. (2004). Rol de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. Rev Cubana Invest Bioméd v.23 n.1 supl.1 Ciudad de la Habana ene.-mar. 2004.

## ANEXO 1

**Hamilton W. Beltrán S.**  
Consultor Botánico  
Alfredo Novoa 230 – San Miguel  
hamiltonbeltran@yahoo.com

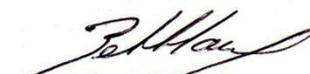
### CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según R.D N. 0171-2011-AG-DGFFS-DGEFFS, con Registro N. 15, certifica que la muestra botánica de la planta conocida como "MATICO SERRANO", proporcionada por la Tesista ELSA BEJAR CAMARENA, ha sido estudiada científicamente y determinada como ***Jungia paniculata*** y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: PLANTAE  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Subclase: Asteridae  
Orden: Asterales  
Familia: ASTERACEAE  
Especie: ***Jungia paniculata* (DC.) A. Gray**

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

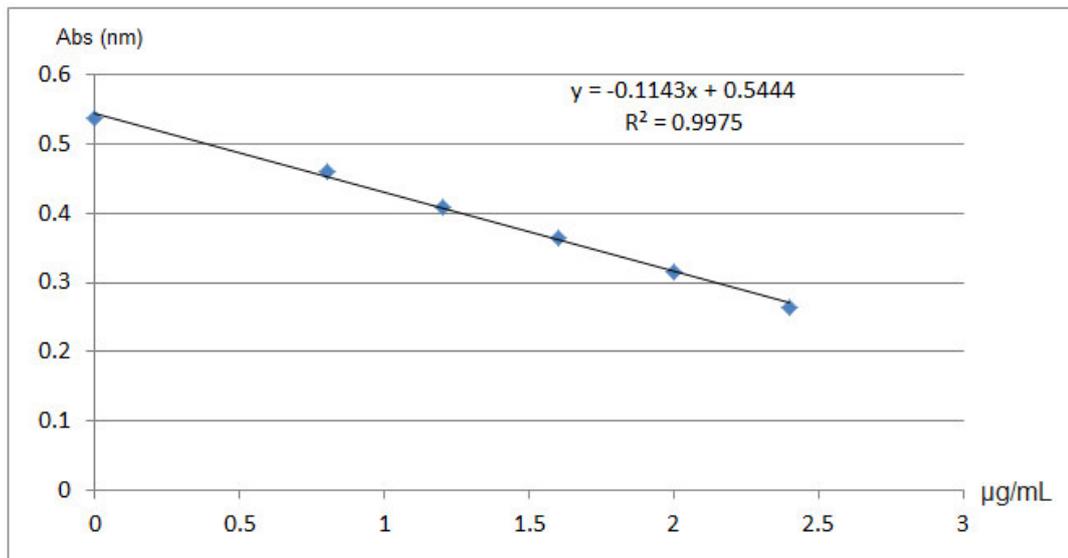
Lima, 26 marzo 2006.

  
Blgo. Hamilton Beltrán

.....  
*Hamilton Wilmer Beltrán Santiago*  
Biólogo - Botánico  
CBR. 2719

## ANEXO 2

## CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA VITAMINA C



## ANEXO 3

## CURVA DE CALIBRACIÓN DEL TROLOX

