



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



[Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0)

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA” DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y
HEPATOPROTECTORA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE FLORES
DE *Cordia lutea* LAM. “Changuaro”**

AUTORES:

- *ALARCÓN ARIAS, RUBÉN ÁNGEL.*
- *SALCEDO PAUCAR, YARIXSA AMBAR;*
- *SOSAYA SALAZAR, MARISOL.*

ICA – PERÚ

2018

DEDICATORIA:

Dedicado a mis padres, quienes con gran esfuerzo, me apoyan día a día para seguir adelante, y cumplir mis sueños, mi mayor bendición es tenerlos a mi lado, guiando mi camino.

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres por apoyarme día a día con sus consejos y enseñanzas.

A mis asesores, quienes han sido más que docentes, amigos, maestros que me han enseñado que el futuro pertenece a aquellos que creen en la belleza de sus sueños.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática.....	9
1.2. Formulación del problema	9
1.3. Justificación e importancia.....	10
1.4. Objetivos de la investigación.....	11
1.4.1. Objetivo general.....	11
1.4.2. Objetivos específicos.....	11
1.5. Hipótesis y variables	11
1.5.1. Hipótesis.....	11
1.5.2. Variables.	12
1.5.2.1. Variable independiente.....	12
1.5.2.2. Variable dependiente.....	12

CAPÍTULO II. BASES TEÓRICAS

2.1. Antecedentes.....	13
2.2. Marco teórico.....	13
2.3. Marco conceptual.....	16

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Estudio fitoquímico	20
3.1.1. Recolección y clasificación de la muestra vegetal	20
3.1.2. Tratamiento de la muestra vegetal.....	20
3.1.3. Obtención del extracto etanólico.....	20
3.1.4. Screening fitoquímico.....	21
3.2. Determinación de la actividad antioxidante.....	21
3.3. Determinación de la actividad hepatoprotectora.....	23
3.4. Prueba de toxicidad aguda	24
3.5. Análisis estadísticos	25

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1. Resultados.....	26
4.2. Discusión de los resultados.....	36
4.3. Conclusiones.....	40
4.4. Recomendaciones	41
4.5. Referencias bibliográficas	42
4.6. Anexos	48

Resumen

*El “Changuaro” es una planta popular en la provincia de Chincha, utilizada tradicionalmente contra afecciones hepáticas. El Objetivo del presente estudio es evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”. **Materiales y métodos:** Mediante un Screening fitoquímico se identificaron grupos de metabolitos secundarios por reacciones de coloración y precipitación. La actividad antioxidante del extracto etanólico de flores se evaluó por los métodos de ABTS 2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonatodiamonio), Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP) e inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH). Para evaluar la actividad hepatoprotectora, se utilizaron ratas albinas cepa Holtzman de 200 – 250 g de peso y 2 meses de edad, distribuidas en 6 grupos de 5 animales cada uno, a los cuales se les administró durante 7 días el extracto etanólico de flores a dosis de 150, 300 y 600 mg/kg; utilizando como control positivo Silimarina- β (100 mg/kg), al octavo día se le administró paracetamol (2000 mg/Kg) para inducir intoxicación hepática. Las enzimas aspartatoaminotransferasa (AST), alaninaaminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), fueron evaluadas en el suero sanguíneo de los animales de experimentación. Se evaluó la toxicidad aguda por el método de las clases, utilizando ratas albinas, administrándoles extracto a una dosis de 2000 mg/kg. **Resultados:** En el extracto etanólico Cordia lutea LAM “Changuaro”. Se identificaron grupos de metabolitos secundarios. Obtuvimos un elevado poder antioxidante evaluado por ABTS, FRAP y DPPH. Asimismo mostró un mejor efecto hepatoprotector que el fármaco de referencia frente a la acción nociva del paracetamol, evaluado por AST, ALT, ALP. El extracto etanólico es no tóxico a la dosis de 2000 mg/kg.*

Palabras claves: Antioxidante, hepatoprotector, paracetamol, toxicidad, Cordia lutea LAM.

Abstract

The "Changuaro" is a plant in the province of Chincha, traditionally used against liver disease. The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity and hepatoprotective of ethanol extract flowers of Cordia lutea LAM "Changuaro".

Materials and Methods: A phytochemical screening secondary metabolites were identified by staining reactions and precipitation. The antioxidant activity of ethanol extract of flowers was evaluated by the methods of ABTS 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonatodiamonio) Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and free radical inhibition versus 2,2-Diphenyl-1-picrilhidraizil (DPPH). To evaluate the hepatoprotective activity Holtzman strain of albino rats weighing 250-300 g, divided into 6 groups of 5 animals each were used, being treated for 7 days with the ethanol extract of flowers at doses of 150, 300 and 600 mg/kg; using as positive control Silymarin- β (100 mg/kg), the eighth day was administered acetaminophen (2000 mg/kg) to induce liver toxicity. The enzyme aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) were evaluated in the blood serum of experimental animals. Acute toxicity class method was assessed using albino rats, administering extract at a dose of 2000 mg/kg.

Results: In the ethanol extract Cordia lutea LAM "Changuaro" various secondary metabolites were identified. We obtained a high antioxidant power evaluated by ABTS, FRAP and DPPH. Best hepatoprotective effect as the reference drug against the harmful effects of paracetamol, evaluated by AST, ALT, ALP, showed no toxicity at a dose of 2000 mg/kg.

Keywords: *antioxidant, hepatoprotective, acetaminophen toxicity, Cordia lutea LAM.*

INTRODUCCIÓN

El siglo XXI se presenta como el siglo de la cultura “anti – envejecimiento”, Comprender cómo y por qué se produce el proceso biológico de envejecimiento es esencial para tomar decisiones fundamentales sobre nuestra salud, calidad de vida y longevidad. Posiblemente, el peligro más importante que acecha de modo continuo a las células proviene de las moléculas oxidantes entre las que destacan diversos tipos de radicales libres, tales como alquil, hidroxil, hipoclorito, oxígeno singlete, peroxi, superóxido y peróxido de hidrógeno.¹

Según se sabe, los excesos de radicales libres pueden dar lugar a la inducción de importantes cambios fisiológicos, que por lo general desembocan en el desarrollo de ciertas enfermedades. Para contrarrestar estos efectos nocivos, el organismo suele disponer de moléculas ricas en electrones que, al donarlos, ejercen un efecto antioxidante. Sin embargo, cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad dañina de los radicales aparece un estrés oxidativo, iniciador de ciertas situaciones patológicas con una mayor o menor trascendencia sobre la salud. Cada vez son más abundantes los estudios que ponen de manifiesto la presencia en los alimentos de origen vegetal de componentes químicos con la capacidad de realizar funciones antioxidantes una vez que han quedado libres dentro del organismo, por lo que su consumo podría significar el desempeño de un papel crítico frente al desarrollo de algunas enfermedades degenerativas reduciendo o retrasando las posibilidades de padecerlas.² El hígado es uno de los órganos más importantes del cuerpo humano. Lleva a cabo funciones vitales, incluyendo metabolismo, producción de enzimas,

conversión de nutriente a energía y desintoxicación. Incluso tiene la habilidad de auto regenerarse si parte de él se daña. Un hígado saludable es esencial para el bienestar de todo el organismo.³

Proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir, o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicalarios, es de suma importancia y los agentes que son capaces de hacerlo son llamados hepatoprotectores.

Si se recurre a la fitoterapia, como alternativa terapéutica, encontraremos a los flavonoides, los cuales ocupan un lugar preponderante en nuestros tiempos, por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores.

El uso de plantas medicinales hepatoprotectoras, ayuda a proteger el hígado de los agentes externos y radicales libres; para que las funciones que realiza sean adecuadas y eviten el daño hepático.⁴

*La especie *Cordia lutea* LAM. “Changuaro” es utilizada popularmente como protector hepático y en afecciones de la misma índole, por los pobladores de la provincia de Chincha, ubicada a 97 m.s.n.m. En la actualidad no se cuenta con evidencia bibliográfica de estudios que avalen su poder antioxidante y hepatoprotector.*

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la necesidad de prevenir y proteger al hígado de los procesos de stress oxidativo nos planteamos el siguiente problema.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

En el Perú, la cirrosis hepática ocupa el quinto lugar como causa de mortalidad y segundo como morbilidad, siendo consecuencia de la intoxicación con alcohol, infecciones virales, cáncer, fármacos, entre otros. La hepatotoxicidad está relacionada a la disfunción o daño asociado a una sobredosis de drogas o xenobióticos. Los resultados de la hepatotoxicidad resultan de la toxicidad directa de los compuestos primarios, sus metabolitos reactivos o de la respuesta inmune que afecta a los hepatocitos, células epiteliales biliares, y/o vasculatura hepática.⁵ De acuerdo a la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), la toxicidad hepática ha sido una de las razones más frecuentes de reportes de seguridad en farmacovigilancia y causas de retiro de medicamentos aprobados en el mercado.⁶ Más de 900 drogas han sido implicadas como una causa de daño hepático.

El hígado es uno de los órganos de mayor importancia de nuestro organismo, encargado de la depuración de toxinas generadas durante nuestros procesos metabólicos, protegerlo de los efectos nocivos, es de suma importancia, motivo por el cual recurrimos a la fitoterapia como alternativa terapéutica.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presenta actividad antioxidante y hepatoprotectora el extracto etanólico obtenido de las flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”?

1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

En los últimos años se ha despertado un gran interés por los radicales y su relación con el envejecimiento celular.

Los radicales libres son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado en su orbital más externo. Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos, pudiendo alterar estructuras biológicas fundamentales como lípidos de membrana, ácidos nucleicos, y proteínas. Todo ello se traduce en un aumento del estrés oxidativo, que está directamente relacionado con el envejecimiento celular y algunos procesos fisiopatológicos como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cataratas y determinadas formas de cáncer.⁷

El hígado es uno de los órganos más importantes del organismo. Participa en la regulación de metabolitos energéticos y realiza una amplia variedad de funciones importantes como la biotransformación de xenobióticos y otras sustancias químicas que ingresan al organismo. Así, el daño al hígado provocado por agentes hepatotóxicos tiene graves consecuencias. Por tanto es importante contribuir al desarrollo de nuevas terapias que ayuden a contrarrestar el daño hepático. Si se recurre a la Fitoterapia, como alternativa terapéutica, encontraremos a los flavonoides, los cuales ocupan un lugar cimero en nuestros tiempos, por sus reconocidas propiedades antioxidantes y su uso como hepatoprotectores.⁸

Brindando a la población una alternativa terapéutica, para el tratamiento y prevención de enfermedades hepáticas, con productos naturales

obtenidos a partir de plantas medicinales, disminuyendo así la tasa de incidencias de enfermedades hepáticas.

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1. OBJETIVO GENERAL:

- *Evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro*

1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- *Identificar los posibles grupos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico obtenido por maceración.*
- *Determinar la actividad antioxidante del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”, a través de: Poder antioxidante de reducción férrica (FRAP), inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH) y reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS).*
- *Cuantificar la actividad hepatoprotectora del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro” mediante el modelo de intoxicación con paracetamol (APAP).*
- *Determinar el grado de toxicidad del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”.*

1.5. HIPÓTESIS Y VARIABLES

1.5.1. HIPÓTESIS

Hipótesis general

El extracto etanólico obtenido de las flores de Cordia lutea LAM. “Changuaro” presenta alta actividad antioxidante y hepatoprotectora.

1.5.2. VARIABLES:

1.5.2.1. Variable independiente:

Extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM. “Changuaro”.

1.5.2.2. Variable dependiente:

Actividad antioxidante y hepatoprotectora.

CAPÍTULO II. BASES TEÓRICAS

2.1. ANTECEDENTES

- *La especie Cordia macleodii., presenta actividad antioxidante y hepatoprotectora, evaluado mediante valores de Aspartatoaminotransferasa, Alaninaminotransferasa, Fosfatasa alcalina, y Bilirrubina total.*⁹
- *La especie Cordia dichotoma, identificada como fuente botánica de Shleshmataka en la farmacopea ayurvédica. Se realizó una investigación actual demostrando actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de Cordia dichotoma in vitro mediante el ensayo de eliminación de radicales libres 1,1, difenil-2, picrilhidrazilo (DPPH).*¹⁰

2.2. MARCO TEÓRICO

En los últimos 30 años viene desarrollándose cada día un interés mayor por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, los radicales libres, las especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes, todo esto dado por la importancia que poseen en la bioquímica, la biología y la medicina. Las ciencias médicas están dando un paso de avance significativo en el conocimiento de muy variadas enfermedades, en su fisiopatología, su tratamiento y más importante aún, en su prevención.

Comprender cómo y por qué se produce el proceso biológico de las enfermedades es esencial para tomar decisiones fundamentales sobre nuestra salud y calidad de vida. Posiblemente, el peligro más importante que acecha de modo continuo a las células proviene de las moléculas oxidantes entre las que

destacan diversos tipos de radicales libres, tales como alquil, hidroxil, hipoclorito, oxígeno singlete, peroxi, superóxido y peróxido de hidrógeno.¹¹

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular.

El hígado constituye el principal centro de biotransformación y eliminación de agentes potencialmente tóxicos, además de su participación en la síntesis y distribución de nutrientes incorporados al organismo. Las funciones que desempeña este órgano son únicas y vitales pues a pesar de que casi todos los tejidos tienen, hasta cierto grado, la capacidad de metabolizar estos productos químicos, el hígado es por excelencia el principal lugar de depuración de sustancias endógenas y exógenas, de ahí que cualquier modificación en alguna de sus funciones traería graves consecuencias para la vida.¹²

Es un órgano susceptible a fenómenos de toxicidad química debido principalmente a su función y localización anatómica. Si además tenemos en cuenta la creciente cantidad de productos químicos que el hombre consume diariamente a través de los alimentos, el agua, los vegetales y medicamentos; es de esperar una sobrecarga de sus sistemas detoxificantes y por consiguiente

*la degradación de determinados compuestos necesarios para la biotransformación y eliminación de estas sustancias ajenas al metabolismo celular conocidas como xenobióticos. La ingestión de compuestos químicos u orgánicos que implican daños funcionales y/o estructurales al hígado provoca hepatotoxicidad o enfermedad hepática tóxica inducida.*¹³

*El Paracetamol, acetaminofén como también se le conoce, es uno de los medicamentos más usados por sus propiedades analgésicas y antipiréticas, además de bajo costo y amplia disponibilidad, lo que ha conllevado a frecuentes casos de sobredosificación y por consiguiente de hepatotoxicidad. Este fármaco induce una reacción tóxica directa a nivel hepático que aunque sus manifestaciones clínicas tempranas son leves e inespecíficas, su pronóstico depende en forma importante de su diagnóstico oportuno.*¹⁴ *Por ello, la búsqueda de alternativas naturales de tratamiento orientadas a proteger al hígado de los efectos nocivos de hepatotoxinas que el hombre puede ingerir o contrarrestar las alteraciones en los mecanismos de defensa antirradicálicos, es un elemento importante en las investigaciones medicofarmacéuticas.*¹⁵

*La Fitoterapia constituye una alternativa farmacológica para resolver de manera complementaria e integral las necesidades primarias de salud. Como consecuencia del desarrollo de nuevos procesos químicos de síntesis se ha hecho improbable explotar las potencialidades de un inmenso número de especies vegetales que sin duda alguna, encierran una amplia diversidad de compuestos químicos desconocidos que podrían llegar a tener un gran valor terapéutico.*¹⁶

Los efectos hepatoprotectores de las preparaciones herbales se deben a su contenido en compuestos polihidroxiados: fenoles, flavonoides, terpenoides y otros metabolitos secundarios con actividad antioxidante, que pueden convertir a las especies reactivas del oxígeno (EROs) en productos más estables.¹⁷ Según sus antecedentes las especies pertenecientes al género Cordia presentan alto contenido de antioxidantes^{9,10}

2.3. MARCO CONCEPTUAL

Alcaloides: *Son moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular con una amplia variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas, como la vincristina y el taxol usados como fármacos anticancerígenos, la morfina como potentes analgésico.*

Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): *Son fármacos utilizados en el tratamiento de afecciones reumáticas o como parte del tratamiento sintomático o etiológico del dolor; presentan evidentes manifestaciones adversas a nivel gastrointestinal, atribuyéndose dicho efecto, entre otros, a la disminución de la síntesis de prostaglandinas, por inhibición de la ciclooxigenasa.²⁰*

Antioxidantes: *Conjunto de compuestos químicos o productos biológicos que contrarrestan de una manera directa o indirecta los efectos nocivos de los radicales u oxidantes como oxidación a lípidos, proteínas.*

Estrés oxidativo: *es uno de los mecanismos involucrados en la hepatotoxicidad aguda, las terapias efectivas para estas enfermedades son todavía limitadas.*

Fitoterapia: *Ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico.*¹⁸

Flavonoide: *Pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana.*¹⁸

Género Cordia: *pertenece a la familia Boraginaceae, con alrededor de 300 especies distribuidas a nivel mundial, en especial en regiones cálidas. De acuerdo a la literatura, se han reportado muchos usos en la medicina tradicional para diferentes especies de este género.*¹⁹

HAT: *Son mecanismos de interacción química que ocurre mediante transferencia de un átomo de hidrógeno.*²⁴

Hepatoprotector: *Es aquel agente o sustancia que tiene principios activos protectores, los cuales aumentan el nivel de detoxificación hepática, evitando la sobresaturación de las vías de conjugación, disminuyendo así el daño hepático.*²¹

Hepatoregenerador: *Es aquel agente o sustancia que tiene principios activos antioxidantes, que actúan después de provocado el daño hepático, bloqueando los radicales libres, protegiendo de forma eficaz la estructura y función de las células del hepatocito promoviendo así la síntesis proteica.*²¹

Metabolitos secundarios: *Constituyentes químicos no esenciales de la planta que se sintetizan en pequeñas cantidades y se le atribuyen propiedades terapéuticas.*²²

Método de FRAP, *se basa en la reducción del complejo Fe^{3+} -TPTZ (hierro-tripiridiltriazina), a Fe^{2+} -TPTZ es decir, lo que mide es la capacidad de un compuesto presente en el alimento de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} .*

EROs: *Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno son un subgrupo de moléculas oxidantes que son altamente reactivas como su nombre lo indica.*²²

Oxidante: *es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par óxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender la biología de las óxido reducciones en el organismo. Las macromoléculas de importancia biológica son de naturaleza nucleofílica, que tienen electrones susceptibles a su captura (oxidación) o son compartidos en una reacción nucleofílica para formar compuestos o aductos.*

Paracetamol: *también conocido como acetaminofén, es un metabolito de la fenacetina, posee propiedades analgésicas y antipiréticas parecidas a las de la aspirina pero no tiene actividad antiinflamatoria, su mecanismo de acción es principalmente por inhibición de prostaglandinas a nivel central, lo cual explica su actividad antipirética efectiva.*²⁷

Plantas Medicinales: *Según la OMS, es aquella que en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica.*²²

Radicales Libres: *son moléculas que no sólo tienen alta reactividad y capacidad oxidativa, sino que además pueden generar reacciones oxidativas en cadena.*²³

SET: *Mecanismo de interacción química basado en la transferencia de un electrón de una sustancia antioxidante a una molécula oxidante.*²⁴

Screening fitoquímico: *consiste en la extracción de la planta con solventes de diferentes polaridades, aplicando reacciones de coloración y precipitación. Permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.*

Transaminasas: *también conocidas como aminotransferasas son enzimas transferasas que catalizan la reacción de transferencia del grupo amino (-NH₂) de un aminoácido a un α -cetoglutarato (un α -cetoácido).*²⁶

Terapia antioxidante: *inhibe los cambios oxidativos deletéreos y es considerada una herramienta muy importante para los tratamientos de las enfermedades hepáticas.*²⁷

Trolox: *(ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) es un análogo hidrosoluble de la vitamina E. Es un antioxidante como la vitamina E y se usa en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el daño oxidativo.*²⁵

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. ESTUDIO FITOQUÍMICO

3.1.1. Recolección y clasificación de la Muestra Vegetal:

La especie vegetal fue recolectada por los autores en la provincia de Chíncha, ubicada a 97 m.s.n.m., en los meses de Agosto – Setiembre del 2017.

Una muestra de la especie vegetal fue enviada para su clasificación en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.1.2. Tratamiento de la Muestra Vegetal:

Se seleccionaron las flores en buen estado, las mismas que fueron secadas en un ambiente ventilado y bajo sombra durante un período de 15 días para su posterior estudio.

3.1.3. Obtención del extracto etanólico por maceración²⁸

500 g de flores secas y molidas son tratadas con 3 L de Etanol 96° macerándose por 7 días, con agitación diaria, se filtra, renovando el solvente y dejando el extracto por espacio de 7 días. Los filtrados son evaporados al vacío en un evaporador rotatorio a 40°C.

Se obtuvo 200 g de extracto etanólico seco de color verde amarillento.

3.1.4. Screening fitoquímico:

Con la finalidad de identificar los grupos de metabolitos secundarios se realizó un screening fitoquímico con 20 g de extracto etanólico seco, basándonos en la extracción por solventes de diferente polaridad, en el que se obtuvo 5 fracciones en las que se realizaron reacciones de coloración y/o precipitación para la identificación de los grupos de metabolitos secundarios.²⁸

3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Ensayo de decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH): *La capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determina por grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH mediante el método de Brand-Williams, con algunas modificaciones. Se preparó una solución madre de DPPH con aproximadamente 20 mg/L del radical en metanol, 990 µL de esta solución se mezclaron con 10 µL de solución de extracto (a diferentes concentraciones). Se preparó un blanco de referencia con 990 µL DPPH y 10 µL de solvente. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm.²⁹ El ensayo se realizó por triplicado y el % de actividad antioxidante fue calculado usando la fórmula:*

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia (Blanco)} - \text{Absorbancia (Muestra)}}{\text{Absorbancia (Blanco)}} \times 100$$

Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS^{•+}: *se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS^{•+} es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. En la evaluación se utilizaron 10 µL de extracto y 990 µL de la solución del radical ABTS^{•+}. A los 4 min de reacción a 37°C, se leyó el cambio en la absorbancia respecto a la referencia del reactivo. La referencia del reactivo consistió en una solución del radical ABTS^{•+} con el solvente de la muestra. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como valores TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) mediante la construcción de una curva patrón de Trolox a partir de una solución stock de 10 mM.³⁰*

Ensayo FRAP (poder antioxidante de reducción férrica): *este método evaluó la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el ión férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que tuvo un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm. Este ensayo se llevó a cabo en un buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), que contenía TPTZ y $FeCl_3$. Se utilizaron 900 µL de esta solución, 50 µL de muestra y 50 µL de agua destilada. Luego de 60 min de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm. Para cada muestra se tuvo en cuenta la*

lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores. La curva de referencia se construyó usando Trolox como patrón primario, realizando diluciones sucesivas a partir de una solución stock de Trolox de 10 mM. El ensayo se realizó por triplicado y las actividades antioxidantes de las muestras se expresaron como TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity)³¹

3.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA

Para el estudio se utilizaron 30 ratas albinas cepa Holtzman machos adultos, cuyos pesos oscilaron entre 200-250 g. se colocaron en jaulas, en un ambiente a temperatura constante, con ciclos alternados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, alimentados con alimento comercial Ratonina y agua ad libitum. Los animales de experimentación fueron distribuidos al azar en seis grupos de cinco animales cada uno.

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI
Control normal	Control APAP	100 mg/kg SIL-β (Hepanavit)	150 mg/kg Cordia lutea LAM "Changuaro" "	300 mg/kg Cordia lutea LAM "Changuaro" "	600 mg/kg Cordia lutea LAM "Changuaro" "

A los grupos I y II se administró el vehículo por siete días consecutivos. A los grupos III, IV, V, VI se les administró las dosis ya señaladas por siete días consecutivos. Al octavo día, después de la administración de los respectivos tratamientos, a todos los animales de los grupos II, III, IV, V, VI se les

administró Acido p-amino fenólico (APAP) a dosis de 2 g/kg. Al día siguiente, para la obtención de la muestra, se anestesió a los animales con pentobarbital sódico y se obtuvo sangre mediante punción cardiaca.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm para obtener el suero sanguíneo, en el cual se determinó marcadores bioquímicos del perfil hepático.

En la determinación de la actividad de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT), fueron utilizados métodos cinéticos estándar, de acuerdo a las recomendaciones del panel de expertos de la IFCC (Federación Internacional de Química Clínica). Sin activación por piridoxalfosfato.^{32,33}

La fosfatasa alcalina (ALP) fue evaluada mediante un método cinético optimizado (DGKC y SSCC), cuya velocidad de aparición del anión p-nitrofenolato a 405 nm, es proporcional a la actividad enzimática de la muestra.^{34,35}

3.4. PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro” se evaluó en ratas albinas cepa Holtzman, usando el método de las clases. Cuatro hembras y cuatro machos (peso: 200-250 g) recibieron el extracto etanólico de Cordia lutea LAM “Changuaro” a una dosis de 2000 mg/kg de peso, por vía oral. Los animales fueron observados para la evaluación de los síntomas tóxicos de forma continua durante las 4 primeras horas después de la dosificación. Por último, se observó el número de

sobrevivientes después de 24 horas y estos animales se mantuvieron durante otros 13 días con observaciones diarias.³⁶ El manejo de los animales de experimentación se realizó según el protocolo de manejo y cuidado de animales de laboratorio de la Facultad de medicina, Universidad de Chile.³⁷

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Al no tener la muestra una distribución normal, se aplicó la prueba Kruskal-Wallis, para comparar medias de más de dos grupos, como post test se aplicó la prueba de Dunn´s y la prueba Mann-Whitney, para comparar medias de dos grupos. Se utilizó el valor $p < 0,05$ para la consideración de diferencia estadísticamente significativa. Para el análisis estadístico, se aplicó el paquete estadístico STATA V.10.0 y GRAPH PAD PRISM V.6.05.

4.1. RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM “Changuaro”.

<i>Screening fitoquímico</i>		
<i>FRACCIÓN</i>	<i>METABOLITOS</i>	<i>RESULTADO</i>
A	<i>Taninos</i>	-
	<i>Aminos libres</i>	+
	<i>Flavonoides</i>	+
	<i>Grupos fenólicos libres</i>	+
B	<i>Triterpenoides y/o esteroides</i>	+
	<i>Nafto y antraquinonas</i>	-
	<i>Flavonoides</i>	+
C	<i>Triterpenoides y/o esteroides</i>	+
	<i>Alcaloides</i>	-
D	<i>Flavonoides</i>	+
	<i>Leucoantocianidinas y catequinas</i>	+
E	<i>Flavonoides</i>	+
	<i>Leucoantocianidinas</i>	+
	<i>Grupos fenólicos libres</i>	+

(+) Resultado positivo leve, (-) Resultado negativo.

FUENTE: Datos de los autores

Tabla 2. Actividad antioxidante por el método de DPPH de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM. “Changuaro”

<i>Concentración (mg/mL)</i>	<i>Absorbancia Blanco</i>	<i>Absorbancia final</i>	<i>% Inhibición Radical DPPH</i>
2.5	0.958	0.110 ± 0.013	88.518
1.25	0.958	0.506 ± 0.004	47.182
0.625	0.958	0.684 ± 0.003	28.601
0.3125	0.958	0.798 ± 0.009	16.702
0.15625	0.958	0.869 ± 0.003	9.290
0.078125	0.958	0.901 ± 0.003	5.950

FUENTE: Datos de los autores

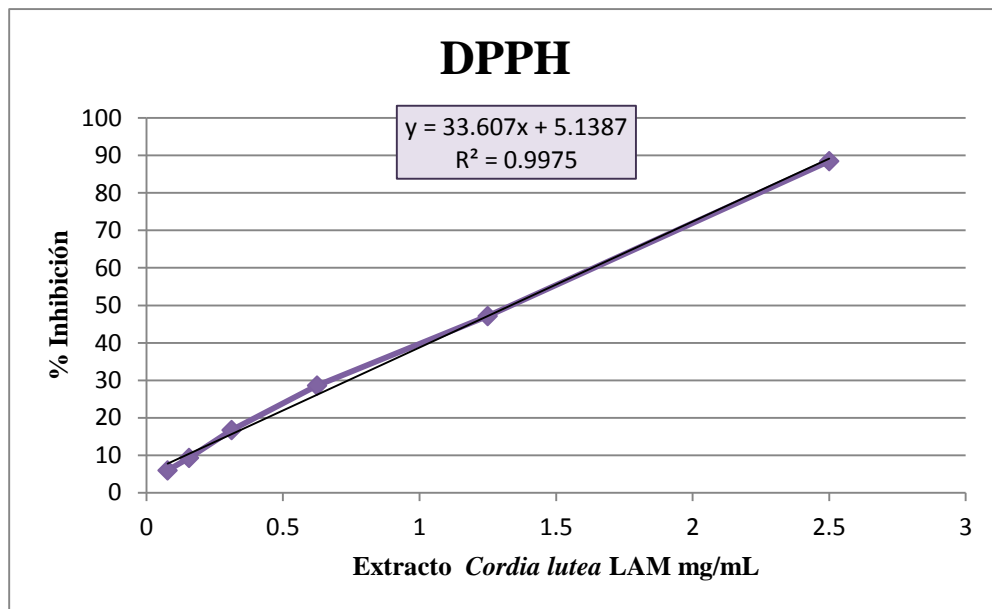


Gráfico 1. Actividad antioxidante equivalente al porcentaje de Inhibición del radical DPPH del extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM. “Changuaro”

La concentración efectiva media (EC₅₀) del extracto etanólico de Cordia lutea LAM. es de 1.335 mg/mL.

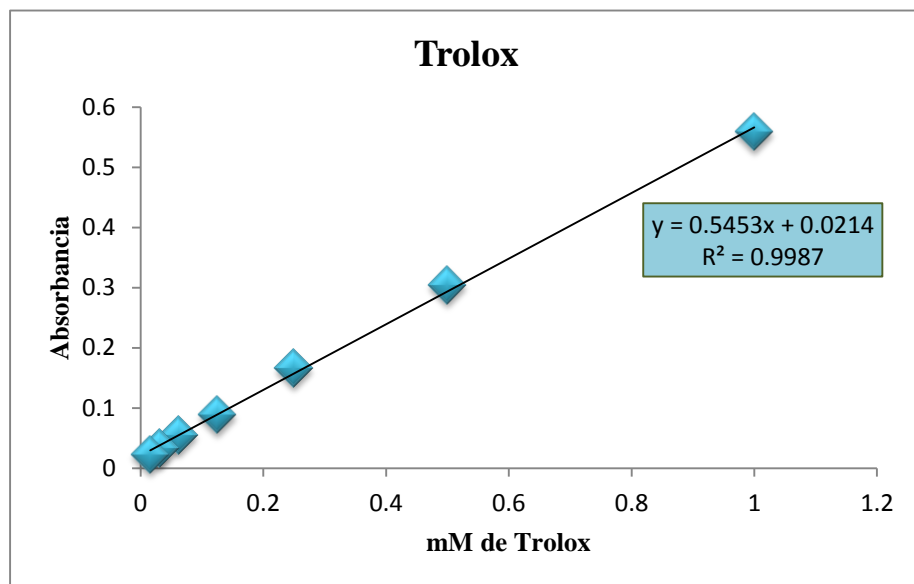


Gráfico 2. Curva de calibración de Trolox por el método de ABTS.

Se construye una curva de calibración que permite verificar la dependencia lineal de las absorbancias del radical vs la concentración del Trolox obteniéndose un R^2 de 0.9987.

Tabla 3. Actividad antioxidante por el método de ABTS de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM. “Changuaro” equivalente a mM de Trolox.

<i>Extracto</i> (mg/mL)	<i>Promedio</i> <i>Absorbancia</i>	<i>Equivalente a</i> <i>Trolox (mM)</i>
0.625	0.4005 ± 0.018	0.695
0.3125	0.2555 ± 0.001	0.429
0.15625	0.1605 ± 0.001	0.255
0.078125	0.0993 ± 0.008	0.143
0.0390625	0.0765 ± 0.001	0.101

FUENTE: Datos de los autores.

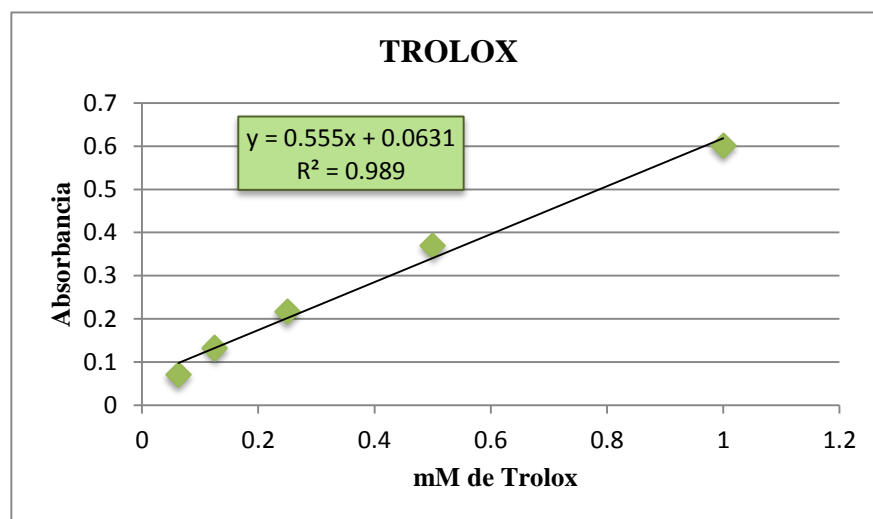


Gráfico 3. Curva de calibración de Trolox por el método de FRAP.

Se construye una curva de calibración (gráfico 3) que permite verificar la dependencia lineal de las absorbancias del radical vs la concentración del Trolox obteniéndose un R^2 de 0.989.

Tabla 4. Actividad antioxidante por el método de FRAP de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM. “Changuaro”

<i>Extracto</i> (mg/mL)	<i>Promedio</i> <i>Absorbancias</i>	<i>Equivalente a</i> <i>Trolox (mM)</i>
0.625	0.126 ± 0.001	0.113
0.3125	0.1013 ± 0.002	0.069
0.15625	0.079 ± 0.001	0.029
0.078125	0.074 ± 0.002	0.020

FUENTE: Datos de los autores.

Tabla 5. Pesos de ratas e hígados según tratamiento.

GRUPO	TRATAMIENTO	Peso corporal ^{NS}	Peso del hígado ^{NS}	
		(g)	Hígado (g)	% p.c.
I	CONTROL	233.25 ± 20.34	7.72 ± 0.43	3.32
II	APAP 2000mg/Kg	231.50 ± 25.85	7.88 ± 0.97	3.40
III	Sil-β 100 mg/Kg	241.33 ± 13.01	7.43 ± 0.50	3.08
IV	CL.LAM 150mg/Kg	240.67 ± 10.69	7.99 ± 1.07	3.31
V	CL.LAM 300 mg/Kg	234.50 ± 16.26	7.84 ± 1.04	3.33
VI	CL.LAM 600 mg/Kg	239.00 ± 16.97	8.35 ± 0.80	3.49

^{NS}= No significativo $p < 0,05$ Test de Kruskal –Wallis.

CL.LAM = Extracto etanólico de flores de *Cordia lutea* LAM. “Changuaro”

FUENTE: Datos de los autores.

Tabla 6. Enzimas marcadoras transaminasas y fosfatasa alcalina en suero sanguíneo de ratas según tratamiento.

GRUPO	TRATAMIENTO	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
I	CONTROL	38.40 ± 4.18	17.27 ± 4.92	272.29 ± 19.05
II	APAP	77.81 ± 11.13* ^a	61.98 ± 5.04* ^a	452.93 ± 24.90* ^a
III	SIL-β 100 mg/kg + APAP	47.15 ± 7.57*	35.97 ± 14.17*	391.24 ± 21.31*
IV	CL.LAM 150 mg/kg + APAP	54.77 ± 13.75	39.70 ± 4.06	386.97 ± 27.68
V	CL.LAM 300 mg/kg + APAP	39.35 ± 16.60 ^a	21.21 ± 4.65 ^a	365.03 ± 12.28 ^a
VI	CL.LAM 600 mg/kg + APAP	37.74 ± 10.00	16.21 ± 1.53	327.54 ± 10.08

Los valores se expresan como media ± desviación estándar de 5 animales de experimentación. APAP = paracetamol, CL.LAM = *Cordia lutea* LAM., SIL-β = Silimarina + complejo B. $p < 0,05$ Test de Mann – Whitney = * (APAP/ SIL-β), ^a (APAP/ C.L.LAM 300 mg/kg).

FUENTE: Datos de los autores.

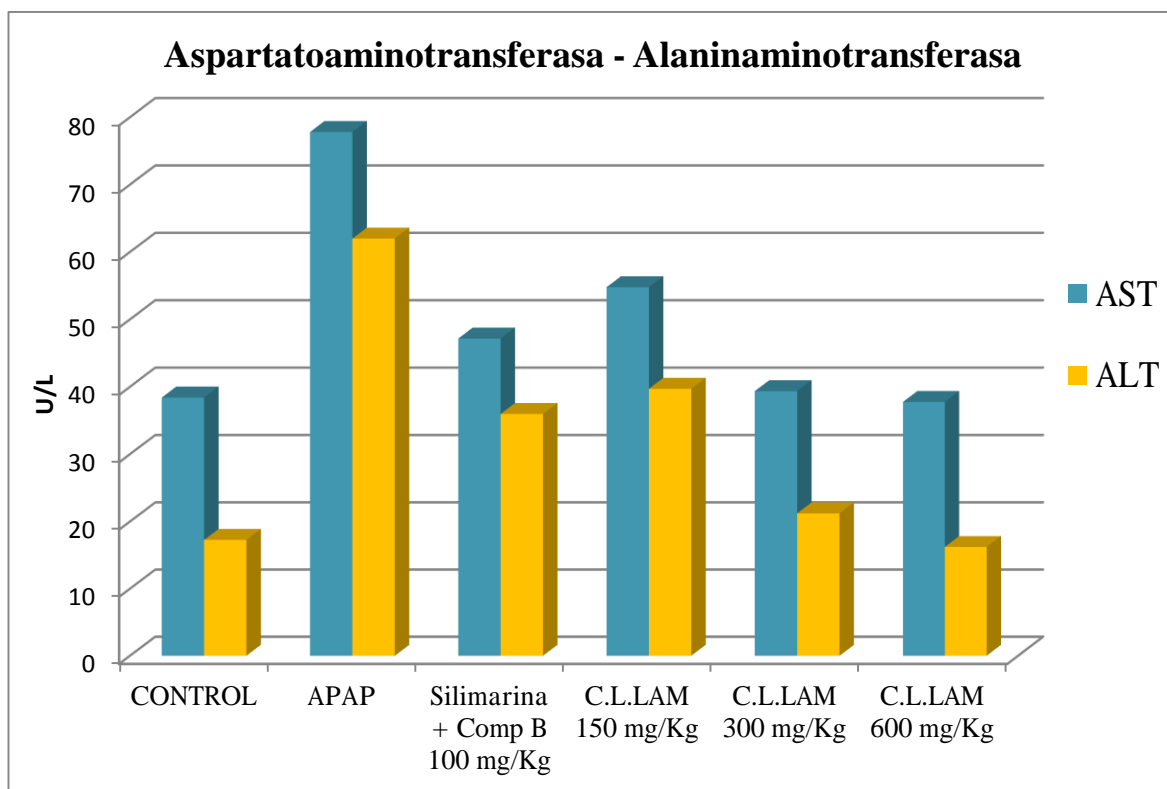


Gráfico 4. Enzimas marcadoras transaminasas en suero sanguíneo de ratas según tratamiento.

Referencia: *Tabla 6*

En los niveles séricos de AST y ALT, existe una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos a un $p < 0,05$ (Test de Dunn's), y se observó que en el grupo II (Paracetamol) presentó mayores niveles de dichas enzimas. Sin embargo, los grupos que fueron tratados con Cordia lutea LAM y Silimarina- β , presentaron niveles inferiores de transaminasas. Asimismo al comparar el grupo V con el grupo VI, no se observó una diferencia estadísticamente significativa a un $p < 0,05$ (Test de Mann Whitney).

4.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las lesiones hepáticas inducidas por medicamentos son extensas y representan aproximadamente la mitad de los casos de enfermedades de insuficiencia hepática aguda y crónica.³⁸

Los polifenoles y flavonoides están presentes en frutas, verduras, extractos vegetales, y constituyen una excelente fuente de antioxidantes que pueden contribuir a restablecer el equilibrio prooxidante / antioxidante en una situación de estrés oxidativo.

Es necesario mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante en los organismos aerobios, porque están expuestos a la generación endógena de especies reactivas del oxígeno (EROs), tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical oxidrilo (OH^-), el óxido nítrico (NO), peróxidos (ROO^-), los cuales dañan las diversas estructuras celulares. En esta situación es muy importante la acción de sustancias endógenas y exógenas que neutralizan dichos efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno (EROs).¹¹

El hígado es el encargado de los procesos de detoxificación en fase I y fase II. En una intoxicación con paracetamol su catabolismo principal por la fase II cambia a la fase I produciendo el radical NAPQI, que ocasiona daños en la arquitectura celular. El Paracetamol (acetaminophen) se usa ampliamente como analgésico y antipirético. Es seguro en dosis terapéuticas, pero causa necrosis e insuficiencia hepática severa en caso de sobredosis. En la administración de altas dosis de paracetamol, las rutas de sulfatación y glucuronización se saturan causando un alto porcentaje de moléculas de paracetamol para ser oxidado a imina N-acetil-p-

benzoquinona (NAPQI) altamente reactivo.³⁹ NAPQI, en particular, se une covalentemente a macromoléculas hepatocelulares, que conducen a la activación de varios procesos bioquímicos como, estrés oxidativo y agotamiento del glutatión (GSH), que resulta en efecto hepatotóxico.⁴⁰

En tal sentido, la administración de sustancias con propiedades antioxidantes podría evitar o disminuir el efecto tóxico de la mencionada droga.⁴¹ Se ha informado, que muchas plantas tienen la capacidad de proteger contra la lesión hepática, debido a compuestos vegetales, como polifenoles, taninos, flavonoides, lignanos, fenoles sencillos, naftoquinonas, que también funcionan como potentes captadores de radicales libres dentro del cuerpo, donde pueden neutralizarlos antes que puedan causar daño celular.⁴²

La especie *Cordia macleodii*, presenta actividad antioxidante y hepatoprotectora, evaluado mediante valores de AST, ALT, ALP, y BILIRRUBINA TOTAL.⁹

Como resultado de nuestra investigación se evidencia una marcada elevación en los niveles séricos de AST, ALT, ALP en las ratas tratadas con 2000 mg/kg de Paracetamol, indicando la generación de daño hepatocelular (Tabla N°6). Sin embargo, estas enzimas séricas están cerca del valor normal en los grupos tratados con el extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM “Changuaro”; el extracto de 300 mg/Kg mostró efecto semejante a 100 mg/Kg Silimarina + Complejo β , $P < 0,05$ (Test Mann-Whitney). Siendo, el extracto de mayor actividad el de 600 mg/Kg, con efecto superior a Silimarina + Complejo β , $p < 0,05$ (Test Mann-Whitney).

En cuando a la determinación de la capacidad antioxidante por el método del radical ABTS se puede observar que existe elevada actividad, puesto que una concentración de extracto etanólico de *Cordia lutea* LAM “Changuaro” de 0.625

mg/mL es equivalente a 0.69 mM de Trolox, existiendo una alta correlación de proporcionalidad positiva entre la concentración y la actividad antioxidante (Tabla 3); de igual manera al determinar la capacidad de captación del radical DPPH se obtuvo una capacidad efectiva media (EC₅₀) de 1.335 mg/mL de extracto, lo que sugiere la elevada capacidad antioxidante del extracto por dicho método (Tabla 2), también demostrado en la especie Cordia dichotoma Forst. f. bark, que mostró actividad antioxidante frente al radical DPPH.¹⁰

Debemos tener en cuenta que ambos métodos utilizados presentan el doble mecanismo de Donación de protones (HAT) y Transferencia de electrones (SET). Asimismo, la actividad antioxidante del extracto fue analizado por el método FRAP, cuyo mecanismo de acción es de Transferencia de electrones, en donde se demostró que 0.625 mg/mL de extracto etanólico de Cordia lutea LAM “Changuaro”, es equivalente a 0.113 mM de Trolox. (Tabla 4). Por lo cual, la elevada actividad antioxidante podría atribuirse a la presencia de compuestos de tipos fenólicos, flavonoides y catequinas determinados en el Screening fitoquímico. (Tabla 1).

Basándonos en nuestros resultados podemos correlacionar que la actividad antioxidante podría ser uno de los mecanismos responsables de la hepatoprotección que presenta esta especie. Por tanto, la presencia de compuestos fenólicos en nuestro extracto etanólico de Cordia lutea LAM “Changuaro”, podría ser responsable de su actividad antioxidante y hepatoprotectora.

Por ende, los resultados del presente estudio resultan innovadores, a partir del cual se puede desarrollar un fitofármaco para el tratamiento de enfermedades

hepáticas, de gran utilización como una alternativa de bajo costo y gran aceptación al uso del fármaco más utilizado en el mercado, tratando de alinear los incentivos de la industria farmacéutica con los intereses sociales, coadyuvando a la promoción de la salud.

4.3. CONCLUSIONES

1. *El extracto etanólico de las flores de Cordia lutea LAM “Changuaro” presenta los siguientes grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, grupos aminos libres, grupos fenólicos libres, triterpenos, catequinas.*
2. *El extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”, a una dosis de 300 mg/kg reduce significativamente los marcadores de daño hepático: AST, ALT, ALP ($p < 0,05$; $p = 0,007$, prueba Kruskal-Wallis; Test Dunn’s) superior al efecto del control (Silimarina- β 100 mg/Kg).*
3. *En el método de DPPH la EC_{50} es 1.335 mg/mL.*
4. *En el método de ABTS 0.313 mg/mL del extracto presenta un TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) de 0.429 mM.*
5. *La actividad antioxidante del extracto etanólico de Cordia lutea LAM “Changuaro”, en el método de FRAP presenta un TEAC de 0.072 mM a 0.313 mg/mL.*
6. *El extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro” no presenta toxicidad aguda a dosis de 2000 mg/kg.*

4.4. RECOMENDACIONES

- 1. Se recomienda realizar un estudio fitoquímico que permita aislar el metabolito responsable de la actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”.*
- 2. Se sugiere realizar un estudio de formulación con el principio activo del extracto etanólico de flores de Cordia lutea LAM “Changuaro”.*

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Lorenzo D, Serrano J, Portero M, Pamplona R. *Nutrigenómica y nutrigenética: hacia la nutrición personalizada*. 1º edición. Libbooks Barcelona S.L.L. 2011. p. 144
2. Roberts W, Gordon M.H. *Determination of the antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay*. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:1486-1493.
3. Urtasun R, Nieto N. *Hepatic stellate cells and oxidative stress*. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007; 99:223-30.
4. Avijeet J. *Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic and aqueous extracts of Momordica dioica Roxb leaves*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008;115:61-66.
5. Pandit A, Sachdeva T, Bafna P. *Drug-induced hepatotoxicity: a review*. *J Appl Pharm Sci.* 2012;2(5):233-43.
6. European Medicines Agency (EMA). *Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity*. London: EMA (Committee for Medicinal Products for Human Use [CHMP]), Doc. Ref. EMA/CHMP/SWP/150115/2006, 2008: 1-16.
7. Yu, BP. *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. *Physiological Reviews.* 1994; 74(1):139-62.
8. Nitha BP, Fijesh V, Janardhanan K. *"Hepatoprotective activity of cultured mycelium of Morel mushroom, Morchella esculenta."* *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 65: 105-112.

9. Naseem N, Bhanudansh S, Nadeem A, Majid A. Actividad antioxidante y hepatoprotectora de las hojas de *Cordia macleodii*. India. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2009; 17, 299– 302.
10. Pankaj B, Nayan R, Vinay J, Rabinarayan A, Mukesh B. In vitro evaluation of antioxidant activity of *Cordia dichotoma* (Forst f.) bark. 2013; *PMC. Gujarat. India*. 2013; 34 (1): 124 – 128.
11. Arnao A, Suárez S, Trabucco J, Cisneros R, Rodrigo M. Efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) en un modelo de intoxicación con acetaminofén. Lima. *Anales de la facultad de medicina*. 2012.
12. Guyton AC, Hall JE. El hígado como órgano. En: *Tratado de Fisiología Médica*. Ed. Interamericana- McGraw-Hill 11a ed, Philadelphia, USA. 2011.
13. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW. *Metabolismo de los xenobióticos*, En: Murray RK. *Bioquímica Ilustrada de Harper*. Ed. Mc Graw-Hill, 28 ed, USA. 2010.
14. Arundel C, Lewis JH. Drug-induced liver disease. *Gastroenterol*. 2006. 23: 244 - 254.
15. Matkowski A, Tasarz P, Szypuła E. Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from *Lamiaceae*, subfamily *Lamioideae*. *J Med Plant Res*. 2008.
16. Castro I. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. *Rev Cub Plant Med*. 2006: 11.

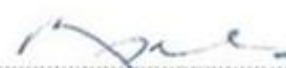
17. Miranda ML, Huacuja L, López AL, Panduro A. *Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. Investigación en salud, publicación del Centro Universitario de investigación en salud. 2005, VIII: 64-70.*
18. Carvalho, D., Costa, H., Gonçalves, T., Ramos, M., Sanches-Silva, A. “Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications”, *Trends Food Sci. & Tech.*, 45 (2) 2015, 336-354.
19. Al-Musayeb, N., Perveen, S., Fatima, I., Nasir, M., Hussain, A. “Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*”, *Molecules* 16. 2011. 10214-10226.
20. Osorio A, Regino W, Zuleta M. *Utilización de AINES y uso de IBP profilácticos en pacientes de medicina interna. Revista Colombiana De Gastroenterología. 2014; 29(2): 125 - 130.*
21. Pally A. *Efecto Protector y Regenerativo del etilendiamino tretaacetato (EDTA) en ratas con daño hepático inducido por paracetamol, Arequipa 2013; 56-58.*
22. Ávalos G, Pérez C. *Metabolismo secundario de plantas. Reduca (biología). Serie biología vegetal. 2009; 2(3): 119 – 145.*
23. Prior, R., Wu, X., Schaich, K. “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements”, *J Agric. Food Chem* 53. 2005: 4290-4302.
24. Nur, Md., Jahan, N, Rafiqzaman, Md., “Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity”. *Saudi Pharm. J* 21. 2013: 143-152.

25. Boulanoar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Miguel, M. "Antioxidant Activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils", *Ind. Crops and Prod.*, 46, 2013: 85-96.
26. Seitz HK, Stickel F. Risks factors and mechanism ofhepatocarcinogenesis with special emphasis on alcohol and oxidative stress. *Biol Chem.* 2006; 387:349-360.
27. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: New vistas of and old drug. *CNC Drugs Review* 2006;12:250-275.
28. Lock O. *Investigación Fitoquímica. Perú: Fondo editorial PUCP; 1994:7-10.*
29. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1999;22:25-30.
30. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Boil. Med.* 1999;26:1231-37.
31. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6.
32. Frankel S, Reitman S, Sonnenwirth AC, editors. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. 7^a Ed. Vol. 1. Saint Louis: The C. V. Mosby Company; 1970.*
33. Schumann, G. *Clin.Chem. Lab. Med.* 40. 2002; 725 – 733

34. Young, D.S. "Effects of drugs on clinical laboratory tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
35. Wiener lab Group. *Vademecum. Reagents for Clinical laboratories.* Rosario: Wiener lab Group; 2000.
36. *OECD Guidelines for testing chemicals, Guidelines 423, acute oral toxicity: acute toxic class method.* Paris, 2001.
37. *Comité de Bioética sobre investigación en animales. Protocolo de manejo y cuidados de animales de laboratorio.* 2010. Universidad de Chile. Facultad de medicina.
38. Chatterjee, T.K. *Medicinal Plants with Hepatoprotective Properties in Herbal Opinions, vol. III. Books and Allied (P) Ltd., Calcutta.* 2000;135.
39. Mitchell JR, Jollow DJ, WZ Potter. *El acetaminofén induce necrosis hepática. Papel del metabolismo de los fármacos Revista de Farmacología y Terapéutica Experimental.* 1973; 187 (1): 185-194.
40. A. Pandey, P. Bigoniya, V. Raj, and K. K. Patel. *Pharmacological screening of Coriandrum sativum Linn. for hepatoprotective activity. J Pharm Bioallied Sci.* 2011 Jul-Sep; 3(3): 435-441.
41. Subramanion L, Azlan Aziz, Yeng Chen, Sreenivasan Sasidharan. *Antioxidant Activity and Hepatoprotective Potential of Polyalthialongifolia and Cassias pectabilis Leaves against Paracetamol-Induced Liver Injury. Evid Based Complement Alternat Med.* 2012: 56-84.
42. Aiyalu Rajase karan, Muthusamy Periyasamy. *Hepatoprotective effect of ethanolic extract of Trichosanthes lobata on paracetamol-induced liver toxicity in rats. Chin Med.* 2012; 7: 12.

*43. Pharmacopeia of the People's republic of China. Edición 2000. Volumen
1. Beijing, China.*

4.6. ANEXOS

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS COORDINACIÓN DE BIOTERIO			
CERTIFICADO SANITARIO Nº		151-2017	
Producto	: Rata Albina	Lote Nº	: R - 09 - 2017
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 40
Cepa	: Holtzman	Edad	: 2 a 2.5 meses
Peso	: 200-250 g.	Sexo	: macho
G.R.	: 029981	Destino	: ALARCON ARIAS, RUBEN
Lima	: 21-09-2017		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, Arturo Rosales Fernández. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.</p> <p>*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p> <p>Chorrillos, 21 de Setiembre del 2017 (Fecha de emisión del certificado)</p> <p>NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p> <p style="text-align: right;"> M.V. Arturo Rosales Fernández C.M.V.P. 1586</p>			



CONSTANCIA N° 37-USM-2017

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama con flores y fruto), recibida de, **Rubén Ángel ALARCÓN ARIAS**, de la Universidad San Luis Gonzaga de Ica; ha sido estudiada y clasificada como: ***Cordia lutea*** Lam. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: POLEMONIALES

FAMILIA: BORAGINACEAE

GENERO: *Cordia*

ESPECIE: *Cordia lutea* Lam.


Nombre vulgar: "Changuaro"

Determinado por: Blgo. Severo M. Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.



Fecha, 23 de setiembre de 2017


Dra. Haydeé Montoya Terreros
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)