

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad gastroprotectora y antisecretora de los
compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans*
neotropica Diels “nogal”. Ayacucho 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por el:

Bach. HUACHACA LAURA, Romel

AYACUCHO - PERÚ

2017

A mis padres Serapio, Laura y
a mis hermanos que siempre
estaré muy agradecido.

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso por permitirme cumplir mis anhelos más profundos de mi corazón y por adentrarme al mundo del saber.

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que hicieron posible mi formación profesional.

A mi asesor Dr. Johnny Aldo Tinco Jayo, por su orientación en la ejecución de este trabajo de tesis.

A todas las personas que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos botánicos de <i>Juglans neotropica</i> Diels. “nogal”	6
2.2.1. Clasificación taxonómica	6
2.2.2. Descripción botánica	6
2.2.3. Usos en la medicina tradicional	6
2.2.4. Composición química	6
2.3. Úlcera péptica	7
2.4. Úlcera gástrica	8
2.5. Protectores de la mucosa	10
2.6. Inhibidores de la bomba de protones	10
2.7. Compuestos fenólicos con actividad gastroprotectora y antisecretora	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Ubicación	13
3.2. Población y muestra	13
3.3. Animales de experimentación	13
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	13
3.4.1. Recolección de la muestra y obtención del extracto hidroalcohólico	13
3.4.2. Aislamiento de compuestos fenólicos	14
3.4.3. Pruebas cualitativas	14
3.4.4. Caracterización cromatográfica de los compuestos fenólicos	14
3.4.5. Evaluación de la actividad gastroprotectora y antisecretora	15
3.4.6. Diseño experimental	15
3.4.7. Método de úlcera gástrica aguda inducida por etanol	15
3.5. Análisis estadístico	18
IV. RESULTADOS	19

V. DISCUSIÓN	29
VI. CONCLUSIONES	35
VII. RECOMENDACIONES	37
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXOS	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Distribución de grupos experimentales para evaluar la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Ayacucho 2017.	16
Tabla 2 Escala de Alada <i>et al.</i> modificada	16
Tabla 3 Escala de Marhuenda	17
Tabla 4 Caracterización de los compuestos fenólicos con reactivo cloruro férrico 5% y ensayo de shinoda presente en el extracto obtenido de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Ayacucho 2017.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estructuras químicas de algunos componentes de <i>Juglans neotropica</i> Diels.	7
Figura 2	Mecanismos de lesión y protección en el estómago.	10
Figura 3	Análisis cromatográfica del extracto de acetato de etilo bajo luz UV contenido de los compuestos fenólicos. Ayacucho 2017.	21
Figura 4	pH del contenido gástrico en los grupos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	22
Figura 5	Contenido gástrico de los grupos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	23
Figura 6	Índice de ulceración gástrica según la escala de Marhuenda observado en los tratamientos: basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	24
Figura 7	Índice de ulceración gástrica según la escala de Alada observado en los tratamientos: basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	25
Figura 8	Porcentaje de inhibición de ulceración gástrica, según la escala de Maruenda, mostrado por los tratamientos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	26
Figura 9	Porcentaje de inhibición de ulceración gástrica, según la escala de Alada, mostrado por los tratamientos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	27

Figura 10 Análisis de los cortes histológicos de estómago. Ayacucho 28
2017.

ÍNDICE DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Certificado de identificación botánica del “nogal”. Ayacucho 2016.	44
Anexo 2	Extracción e identificación cualitativa de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Ayacucho 2017.	45
Anexo 3	Separación cromatográfica de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Ayacucho 2017.	46
Anexo 4	Gráfica de las lecturas espectrales realizado en el espectrofotómetro Genesys 6. UV/VIS de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”. Ayacucho 2017.	47
Anexo 5	Etapas de la evaluación de la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.	48
Anexo 6	Matriz de variables de estudio. Ayacucho 2017.	49
Anexo 7	Porcentaje de inhibición de la ulceración según la escala de Marhuenda. Ayacucho 2017.	51
Anexo 8	Porcentaje de inhibición de la ulceración según la escala de Alada <i>et al.</i> Ayacucho 2017.	52
Anexo 9	Análisis de varianza y subconjuntos homogéneos (HSD Tukey) del pH y contenido gástrico (mL). Ayacucho 2017.	53
Anexo 10	Análisis de subconjuntos homogéneos (HSD Tukey) entre control y tratamiento de los variables dependientes pH y contenido gástrico (mL). Ayacucho 2017.	54
Anexo 11	ANOVA de Kruskal- Wallis y comparaciones múltiples del índice de ulceración según la escala de Marhuenda. Ayacucho 2017.	55
Anexo 12	Matriz de consistencia. Ayacucho 2016.	56

RESUMEN

La medicina tradicional peruana ha utilizado extractos de plantas desde tiempos remotos en el tratamiento de dolencias gastrointestinales. Sobre esta base, investigaciones recientes han reportado compuestos de origen vegetal con reconocida capacidad citoprotectora como los flavonoides. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en “cobayos”. Se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho. El diseño experimental fue con postprueba únicamente y grupo control, donde se agruparon, de manera aleatoria, siete grupos de ocho animales cada uno: grupo blanco, grupo control, dos grupos tratados con omeprazol y sucralfato, y tres grupos que recibieron, respectivamente, dosis de 0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg de compuestos fenólicos de hojas de *Juglans neotropica* Diels recolectadas en la ciudad de Ayacucho. El modelo experimental *in vivo* fue úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96%. La dosis con mayor actividad gastroprotectora fue al 2,0 mg/kg, con un porcentaje de inhibición de 96,8% e índice de ulceración media de 0,3, según la escala de Marhuenda estadísticamente diferente, siendo el valor de $p = 0,000$ ($p < 0,05$) del grupo control que mostró un índice de ulceración medio de 7,8, concordante con los análisis histopatológicos, donde, sólo se apreció discreto edema. No se apreció actividad antisecretora, siendo el valor de $p = 0,960$ ($p > 0,05$) con respecto al grupo control, siendo estadísticamente similar. Se concluye que los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” únicamente tienen actividad gastroprotectora.

Palabras clave: actividad gastroprotectora y antisecretora, compuestos fenólicos, *Juglans neotropica* Diels “nogal”.

I. INTRODUCCIÓN

La formación académica y científica del químico farmacéutico en la universidad tiene un compromiso especial y directo con el desarrollo de nuestro país, principalmente en temas de salud.

Durante nuestra formación universitaria hemos comprendido que es posible resolver los problemas de salud integrando la medicina tradicional a la medicina científica convencional, pero antes es necesario demostrar objetivamente la validez de aquella mediante estudios experimentales y clínicos. Este es el trasfondo principal de este trabajo.

Nos hemos centrado en una de las patologías más importantes del aparato digestivo que constituye un problema médico-social de trascendencia económica a escala mundial: la úlcera péptica, de la cual se estima que casi el 20% de los individuos pueden sufrir ulceraciones pépticas durante su vida, siendo responsables varios factores tales como el estrés, dieta, tabaco, alcohol y cierto tipo de drogas.¹ Para hacer frente a esta patología la medicina tradicional sigue utilizando extractos de plantas, experiencias que sirvieron de base para investigaciones que han reportado que dichas plantas contienen compuestos con reconocidas capacidades citoprotectoras como los flavonoides, que muestran actividad frente a la úlcera péptica, reduciendo el índice de ulceración y la intensidad del daño de la mucosa, que pueden ser mediados por distintos mecanismos (gastroprotector y antisecretor).²

El tratamiento de las patologías gastrointestinales a partir de especies vegetales o sus preparados, además de poder lograr una medicación eficaz, tiene por finalidad promover la conservación y el manejo racional de los recursos, el desarrollo socioeconómico y el mejoramiento de la calidad de vida de la población.³

Los aspectos antes mencionados representaron el punto de partida de este trabajo de tesis; por lo que, de entre tantas especies vegetales que nos ofrece la

medicina tradicional para solucionar el problema en mención, *Juglans neotropica* Diels “nogal”, una especie de amplio uso medicinal y cuyo contenido de compuestos fenólicos está reportado ampliamente, fue objeto de investigación.

El presente trabajo de tesis se orientó hacia el logro del siguiente objetivo general:

Evaluar la actividad gastroprotectora y antsecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.

Los objetivos específicos trazados fueron:

- Identificar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto obtenido de las hojas de *Juglans neotropica* Diels.
- Caracterizar cromatográficamente los compuestos fenólicos aislados.
- Realizar el estudio histopatológico de los tejidos gástricos extirpados.
- Determinar la dosis con mayor actividad gastroprotectora y antsecretora.

El presente trabajo de tesis es el resultado del trabajo metódico y cuidadoso, desde el aislamiento de los compuestos fenólicos, su evaluación a través de ensayos experimentales *in vivo* e histológicos, la aplicación de un modelo experimental de úlcera aguda inducida por etanol, hasta el análisis de los datos obtenidos y su redacción.

Esperamos que el presente trabajo de tesis contribuya al conocimiento de las propiedades farmacológicas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, que sirva de referencia para otros estudios de mayor precisión y, sobretodo, sirva como evidencia científica para estudios preclínicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Hurtado, P. (2014), determinó la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Para la evaluación de la actividad gastroprotectora se empleó el modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96°, administrando el extracto a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg, omeprazol 20 mg/kg y sucralfato 3 mL/kg. La evaluación macroscópica fue mediante la escala de Alada *et al.* Modificada y la de Marhuenda. El extracto dio positivo para carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides. La cuantificación del compuesto fenólico mayoritario fue de 16,909 ± 0,382 mg equilibrio de ácido gálico/g del extracto seco. El tratamiento con el extracto produjo una inhibición de las úlceras gástricas de 84,61% y 94,77% a dosis de 250 y 500 mg/kg respectivamente con un $p < 0,05$. En el estudio histopatológico se observó descamación y aumento de macrófagos en el grupo control, mientras que el grupo G (nogal 500 mg/kg) presentó mayor protección que en los grupos de 50 y 250 mg/kg, donde se observó solo descamación e hipertrofia. De este estudio se concluyó que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” fue efectivo como agente gastroprotector en un modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96°. ⁴

Aguedo *et al.* (2008), evaluaron el efecto gastroprotector de los flavonoides del extracto etanólico de las partes aéreas de *Satureja sericea* (goyal). En este estudio se colectó y estudió las partes aéreas de *Satureja sericea* (goyal), se secó bajo sombra, se pulverizó y se obtuvo el extracto por maceración hidroalcohólica. Se realizó marcha de solubilidad y marcha fitoquímica en la que se observó gran cantidad de compuestos fenólicos, se comprobó la presencia de por lo menos cuatro compuestos fenólicos tipo flavonoides, mediante reacciones de coloración y precipitación, fueron aislados mediante cromatografía en capa

fina a escala preparativa y se elucidó su estructura mediante espectroscopia UV visible en etanol y con reactivos de desplazamiento. En el extracto hidroalcohólico se determinó el efecto gastroprotector mediante el método descrito por Zhang *et al.* Y Liu *et al.* En ratas albinas Holzman. Previo ayuno de 24 horas, seleccionaron cinco grupos y se administró por canulación orogástrica, se obtuvo a dosis de 1000 mg del extracto hidroalcohólico por kg de peso una gastroprotección de un 95% con respecto al estándar de comparación.⁵

Juro *et al.* (2010), determinaron el efecto cicatrizante de diferentes formas farmacéuticas de aplicación tópica elaboradas con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels en ratones albinos, se usaron hojas recolectadas en la localidad de Urubamba y se realizaron cortes de 1cm² en el área dorsal escapular de ratones, a quienes en una primera fase del estudio se les aplicó el extracto a diferentes concentraciones (2,5% - 40%), durante 21 días, luego de lo cual fueron sacrificados e inmediatamente se realizó la prueba del tensiómetro propuesto por Vaisberg. En la segunda fase, se formularon cinco formas farmacéuticas tópicas (pomada, emulsión agua en aceite (A/O), emulsión aceite en agua (O/A), pasta e hidrogel) las que se evaluaron según prueba del tensiómetro, en comparación al fármaco patrón (Cicatrín®). La concentración mínima efectiva cicatrizante fue de 5%, encontrándose una relación concentración-cicatrización en el rango de 2,5% a 30% y una relación formulación-cicatrización, pues las presentaciones en emulsión O/A e hidrogel obtuvieron mayor resistencia a la fuerza de tensión, incluso mayor a la del fármaco patrón. Los resultados fueron corroborados con el estudio histológico. Concluyeron que tanto el extracto hidroalcohólico al 5% como las formas farmacéuticas de emulsión O/A e hidrogel presentaron muy buena actividad cicatrizante.⁶

Palomino *et al.* (2010), evaluaron el efecto gastroprotector del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Guilleminea densa* (Hum. ex Willd.) Moq. (Sanguinaria), en ratas. Administraron las siguientes sustancias: grupo A (suero fisiológico), grupo B (ranitidina 50mg/kg), grupo C (sucralfato 500mg/kg), grupo D (extracto 200 mg/kg), grupo E (400 mg/kg) y grupo F (600 mg/kg); el método utilizado fue el descrito por Robert en 1979. Para el análisis de los GS-NP se empleó el método de Sedlak y Lindsay; y el método modificado de Corne para determinar moco. Los resultados gastroprotectores fueron evaluados expresando el índice de lesión: A, 55 ± 6,16; E, 22,67 ± 8,24 y F, 9,5 ± 2,95. Se observó un

mayor efecto a la dosis de 400 y 600 mg/kg siendo significativo ($p < 0,01$). En el análisis de los grupos sulfhidrilos no proteicos ($\mu\text{g GS-NP/mL/g}$ tejido) se obtuvo: A, $66,16 \pm 22,7$; E, $65,42 \pm 17,30$ y F, $62,26 \pm 15,24$. Se concluyeron que el extracto hidroalcohólico de *Guilleminea densa* posee efecto gastroprotector frente al etanol 80% a dosis de 400 y 600 mg/kg. Dicho sea de paso, llegaron a demostrar la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides y taninos), alcaloides y esteroides; el tratamiento con extracto a dosis de 600 mg/kg ha reducido significativamente el índice de lesiones gástricas; un mecanismo de protección es el incremento de moco gástrico a la dosis de 400 mg/kg; sin embargo, el tratamiento con extracto a diferentes dosis no indujo producción de los GSNP y a nivel histológico se comprueba la ausencia de úlceras a dosis de 600 mg/kg.⁷

Hurtado *et al.* (2015), evaluaron la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de las hojas de *Juglans neotropica* Diels. Se usaron hojas provenientes del distrito de Huandoval, provincia de Pallasca, Región Ancash. La actividad antioxidante fue determinada por el ensayo de inhibición de DPPH. Como resultado, en tamizaje fitoquímico hubo mayor concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante se presentó a 25 y 35 $\mu\text{g/mL}$, con un porcentaje de captación de 89,89 y 92,47%. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de hojas de *Juglans neotropica* Diels a presentando alta actividad antioxidante, con 92,47 % de captación de radical DPPH a 35 $\mu\text{g/mL}$.⁸

Quiroz R. (2013), evaluó la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de nogal (*Juglans neotropica* Diels), ortiga (*Urtica dioica* L.), sábila (*Aloe vera*), con heridas inducidas en el dorso de los ratones previamente de piladas (*mus musculus*). Demostró que los metabolitos secundarios presentes son: compuestos fenólicos y/o taninos, flavonoides, mucilagos, compuestos que le dan la actividad cicatrizante, se experimentó en ratones divididas en 5 grupos: siendo A (control negativo), B (control positivo) utilizando lamoderm, C, D, E, a los cuales se les aplicó gel al 30% a diferentes formulaciones: F1 (10% Nogal, 10% Ortiga, 10% Sábila), F2 (15% Nogal, 10% Ortiga, 5% Sábila), F3 (20% Nogal, 5% Ortiga, 5% sábila), por vía tópica con hisopos estériles se aplicaron dos veces al día por tiempo requerido, y se extrajo la piel para el análisis histopatológico. Se concluyeron que el gel posee actividad cicatrizante, debido a la presencia de taninos de nogal, flavonoides de ortiga, y mucílagos de sábila, que al combinarse presentan sinergia.⁹

2.2. Aspectos botánicos de *Juglans neotropica* Diels. “nogal”

2.2.1. Clasificación taxonómica (Anexo 1)

- DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
- CLASE : MAGNOLIOPSIDA
- SUB CLASE: HAMAMELIDAE
- ORDEN : JUGLANDALES
- FAMILIA : JUGLANDACEAE
- GENERO : *Juglans*
- ESPECIE : *Juglans neotropica* Diels.
- N.V. : “nogal”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis*- 2017

2.2.2. Descripción botánica

Árbol de hasta 35 m de altura y de 30 a 120 cm de diámetro. Tiene el fuste recto y cilíndrico, corteza externa agrietada, color marrón oscuro a negruzco, con placas rectangulares que se desprenden espontáneamente, la interna color crema claro. Hojas compuestas y alternas. Mide 20 a 45 cm de largo con 4 a 12 pares de hojuelas, cada una de ellas de 5 cm a 10 cm de largo, ápice agudo y borde aserrado; cubiertas de finos y diminutos pelos por el reverso, lo que les otorga una textura afelpada. Las hojas frescas poseen olor a melaza al estrujarse. Flores muy pequeñas de un solo sexo, agrupadas en espigas pendulares separadas. Las masculinas miden de 5 a 9 mm y tienen numerosos estambres, las femeninas miden de 2 a 5 mm y poseen un solo pistilo. Frutos globosos, de 4 a 6 cm de diámetro, con superficie lisa, poseen pulpa carnosa y una semilla muy dura y leñosa blanquecina comestible. Los episodios de floración han sido registrados entre noviembre y diciembre; la fructificación, entre diciembre y marzo.⁴

2.2.3. Usos en la medicina tradicional

Las hojas son consideradas fuente de compuestos saludables y han sido usadas ampliamente en la medicina tradicional para el tratamiento de dermatitis, insuficiencia venosa y úlceras; y posee propiedades antidiarreicas, antihelmínticas, antisépticas, antibacterianas, astringentes, antioxidantes, anti fúngicos, hipoglicémicas y antiproliferativas. Se ha reportado que las flores poseen propiedades antidepresivas, antihipóxicas, antihemolíticas y antiinflamatorias. Los frutos también poseen propiedades antioxidantes.⁴

2.2.4. Composición química

Se ha identificado en las semillas compuestos fenólicos: ácido gálico, ácido elágico, ácido cafeico y taninos. En las hojas, se identificaron nueve compuestos

fenólicos: tres derivados del ácido hidroxicinámico y seis heterósidos flavonoides. El fruto posee quinonas juglona y 1,4-naftaquinona, y en el epicarpio se ha detectado el compuesto currumicidín de estructura desconocida. En la corteza del tallo se han identificado quinonas juglona y regiolona; triterpenos betulina y ácido betulínico; esterol, beta-sitosterol; alcaloide de isoquinolina berberina; el flavonoide catequina; y el compuesto fenólico ácido cafeico. La corteza de la raíz contiene quinonas juglona, 3-3'-bis-juglona y ciclo-tri-juglona; y beta-sitosterol. En el polen se ha detectado el flavonoide 3-0-glucosil-galactósido-quercetina, y en la semilla el alcaloide indólico 5-hidroxi-triptamina.⁴

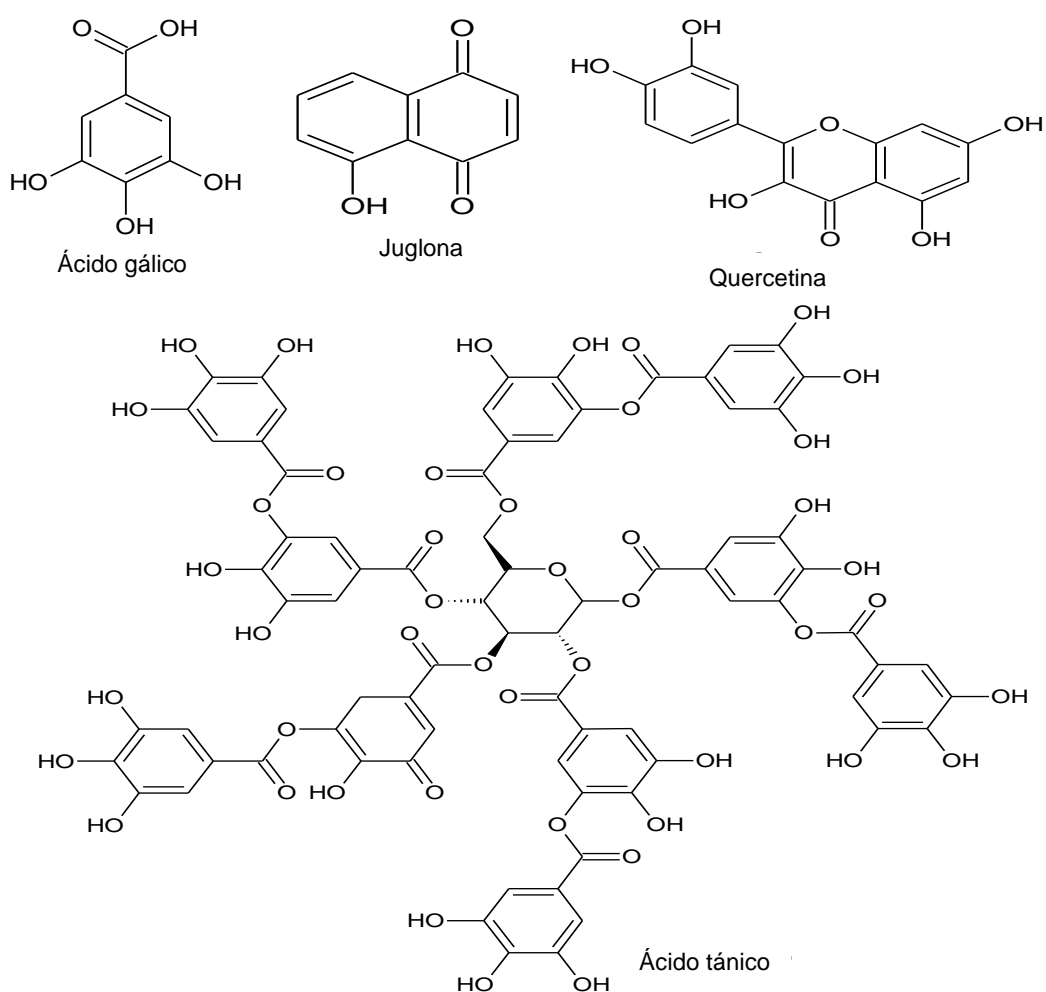


Figura 1. Estructuras químicas de algunos componentes de *Juglans neotropico* Diels.¹⁰

2.3. Úlcera péptica

Una úlcera se define como la pérdida de la integridad de la mucosa del estómago o del duodeno que produce un defecto local o excavación a causa de inflamación activa. Las úlceras se producen en el estómago o el duodeno, y con frecuencia son de naturaleza crónica.¹¹

La úlcera péptica es una pérdida de sustancia circunscrita de la membrana mucosa que penetra hasta la *muscular mucosae* y, a veces, a la submucosa y a la capa muscular. Puede situarse en cualquier zona del tracto digestivo expuesta al jugo gástrico que contiene ácido y pepsina. Su localización más frecuente es el estómago o el duodeno, aunque también puede presentarse en el esófago, o aparecer después de la gastroyeyunostomía. Hoy se distinguen las úlceras duodenal y gástrica como enfermedades fundamentalmente diferentes con fisiopatología, presentación clínica y tratamientos distintos.¹²

2.4. Úlcera gástrica

Los defectos focales de la mucosa gástrica que aparecen agudamente son una complicación de sobra conocida del tratamiento con AINE. También pueden aparecer tras un estrés fisiológico intenso. Algunas de estas lesiones reciben nombres específicos, según su localización y asociaciones clínicas.¹³

La úlcera gástrica se diferencia de la gastritis por la profundidad de la lesión; en las úlceras gástricas las lesiones penetran la totalidad de la mucosa. El cráter de la mucosa por lo general está rodeado por una porción de mucosa inflamada, pero íntegra, lo cual sugiere que la gastritis constituye una lesión predisponente para el desarrollo de la úlcera gástrica. La mayor parte de las úlceras gástricas se presentan en la curvatura menor del estómago.¹⁴

La patogenia de la ulceración aguda es compleja y no se conoce con detalle. Las úlceras inducidas por AINE están relacionadas con la inhibición de la ciclooxigenasa, lo que impide la síntesis de prostaglandinas y, a su vez, aumenta la secreción de bicarbonato, inhibe la secreción de ácido, favorece la síntesis de mucina y aumenta la perfusión vascular. Las lesiones asociadas a la lesión intracraneal parecen deberse a la estimulación directa de los núcleos vagos, lo que provoca la hipersecreción de ácido gástrico. La acidosis sistémica, un hallazgo frecuente en estas condiciones, también contribuye a la lesión de la mucosa al reducir el pH intracelular de las células mucosas. La hipoxia y el descenso del flujo sanguíneo causados por la vasoconstricción esplácnica inducida por el estrés también contribuye a la patogenia de las úlceras agudas.

Los desequilibrios entre las defensas de la mucosa y las fuerzas nocivas que provocan la gastritis crónica también son responsables de la enfermedad ulcerosa péptica (EUP) (**Figura 2**). Es por ello que la EUP se desarrolla sobre la base de una gastritis crónica. No se sabe por qué algunas personas desarrollan solamente gastritis crónica, mientras que otras desarrollan la EUP. La infección

por *H. pylori* y los AINE son las causas subyacentes más importantes de la EUP y ambos comprometen las defensas de la mucosa a la vez que provocan su lesión. Aunque más del 70% de los sujetos con EUP están infectados por *H. pylori*, menos del 20% de las personas infectadas desarrolla una úlcera péptica. Es probable que los factores del anfitrión y también las variaciones en las cepas de *H. pylori*, determinen la evolución clínica. La hiperacidez gástrica que domina en la EUP se puede deber a la infección por *H. pylori*, hiperplasia de células parietales, respuestas secretoras excesivas o deterioro de la inhibición de los mecanismos estimuladores, como la liberación de gastrina. Por ejemplo, el síndrome de Zollinger-Ellison, en el que aparecen múltiples úlceras pépticas en el estómago, duodeno e incluso en el yeyuno, se debe a la liberación no controlada de gastrina por un tumor y la consiguiente producción masiva de ácido. Los cofactores más frecuentes en la ulcerogenia péptica son el uso crónico de AINE, que causan una irritación química directa a la vez que suprimen la síntesis de prostaglandinas necesarias para la protección de la mucosa, el consumo de cigarrillos, que deteriora el flujo sanguíneo y la cicatrización de la mucosa y el consumo de corticoesteroides de dosis altas, que suprimen la síntesis de prostaglandinas y deterioran la cicatrización. Las úlceras duodenales son más frecuentes en sujetos con cirrosis alcohólica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia renal e hiperparatiroidismo. En estas dos últimas afecciones, la hipercalcemia estimula la producción de gastrina y, por tanto, aumenta la secreción de ácido. Por último, el estrés psicológico propio o exógeno también aumenta la producción gástrica de ácido.¹³

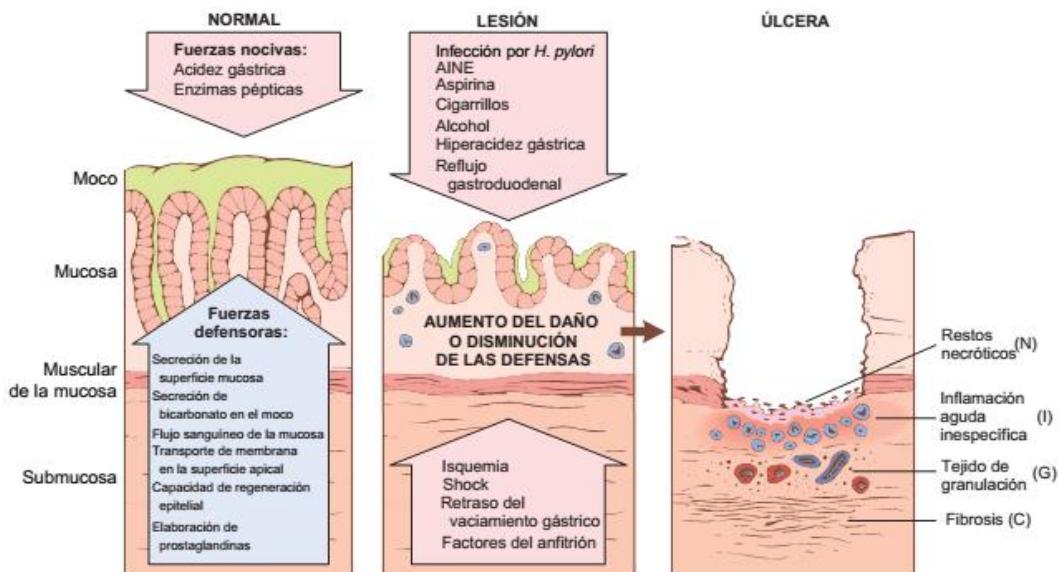


Figura 2. Mecanismos de lesión y protección en el estómago. En este diagrama se muestra la progresión desde las formas más leves de lesión a la ulceración que pueden presentarse con la gastritis aguda o crónica. Las úlceras comprenden capas de necrosis (N), inflamación (I) y tejido de granulación (G), pero la cicatriz fibrótica (C), que tarda tiempo en desarrollarse, sólo aparece en las lesiones crónicas.¹³

2.5. Protectores de la mucosa

Estos fármacos son útiles en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con la secreción ácida; sin embargo, se muestran inferiores a los modernos inhibidores, tanto en términos de eficacia (porcentaje de cicatrizaciones y rapidez con que se consigue) como en el control de la sintomatología dolorosa que acompaña a estos procesos, por lo que han sido relegados al tratamiento de casos aislados en los que la utilización de antisecretores no se aconseja. Su uso continúa teniendo cierta vigencia en la profilaxis de las lesiones de la mucosa gastroduodenal producidas por AINES, aunque también en este caso, la inhibición de la secreción ácida goza de mayor preferencia. Los más utilizados en el Perú son: subsalicilato de bismuto y sucralfato.⁴

2.6. Inhibidores de la bomba de protones

Este grupo de compuestos actúa selectivamente sobre el eslabón final del proceso de secreción ácida gástrica, la ATPasa-H⁺/K⁺ o bomba de protones. Esta enzima representa un paso obligado en el proceso de secreción de H⁺ por lo cual, y en contraste con los antagonistas H₂, la capacidad inhibitoria de estos fármacos es independiente del estímulo desencadenante de la producción ácida. Los fármacos más usados de este grupo son: omeprazol, esomeprazol, lanzoprazol y pantoprazol.⁴

2.7. Compuestos fenólicos con actividad gastroprotectora y antisecretora

Se han llevado a cabo muchos estudios que apoyan fuertemente la contribución de los polifenoles a la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y diabetes mellitus, y sugieren un papel en la prevención de la úlcera péptica. Los polifenoles exhiben una serie de propiedades farmacológicas sobre trastornos gastrointestinales, actuando como agentes antisecretor, citoprotector y antioxidante. Las propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos han sido ampliamente estudiadas, pero ha quedado claro que sus mecanismos de acción van más allá de la modulación del estrés oxidativo. Se han descrito varios compuestos polifenólicos por su actividad antiulcerogénica con un buen nivel de protección gástrica. Además de su acción como gastroprotectora, estos compuestos fenólicos pueden ser una alternativa para el tratamiento de las úlceras gástricas. Por lo tanto, teniendo en cuenta el importante papel de los compuestos polifenólicos en la prevención o reducción de lesiones gástricas inducidas por diferentes agentes ulcerogénicos.¹⁵

a. Flavonoides

Los flavonoides, que se encuentran, tanto en estado libre como heterosídico, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales. En la actualidad se conoce más de 2000 de estos compuestos, de los que unos 500 se encuentran en estado libre. Este grupo es conocido por sus efectos antiinflamatorios y antialérgicos, por sus propiedades antitrombóticas y vasoprotectoras, por la inhibición de la promoción de tumores y como protectores de la mucosa gástrica. Estos efectos se han atribuido a la influencia de los flavonoides sobre el metabolismo del ácido araquidónico.¹⁶

Son compuestos fenólicos, son en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de flores y de algunos frutos; que poseen 15 átomos de carbono, en los cuales dos núcleos bencénicos están unidos por un eslabón de tres carbonos.²

b. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles, que presentan junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. Las aplicaciones de drogas con taninos son limitadas y derivan de sus propiedades astringentes: por vía interna ejercen un efecto antidiarreico y antiséptico, por vía externa impermeabilizan las capas más externas de la piel y

mucosas, protegiendo así las capas subyacentes; a esto hay que añadir un efecto vasoconstrictor sobre los pequeños vasos superficiales.²

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

Laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” que crece en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga a 2750 msnm.

3.2.2. Muestra

3 kg de hojas frescas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, que crece en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga a 2750 msnm.

3.3. Animales de experimentación

56 cobayos machos de la línea Perú adquiridos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), adultos entre 400 y 500 g de peso.

3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1. Recolección de la muestra y obtención del extracto hidroalcohólico

- Se recolectó 3 kg de hojas durante el mes de enero de 2017, en el distrito de Ayacucho. Una muestra botánica sirvió para su clasificación taxonómica en el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- La muestra se secó a temperatura ambiente, previa limpieza de la misma, bajo sombra, sobre bases de papel periódico con recambio constante y remoción de la muestra para un secado uniforme.
- Una vez seca, la muestra fue molida en una licuadora hasta polvo fino.
- 500 g de droga molida se sometió a extracción por maceración simple con 2 L de etanol al 80%, durante 14 días, en frasco de vidrio ámbar de cierre hermético y con agitación periódica.

- El extracto se filtró al vacío con papel filtro Watman N°40, se concentró en un evaporador rotatorio BUCHI–3000 a presión reducida hasta consistencia siruposa y finalmente a sequedad en una estufa Memmert a 47°C.
- El extracto seco obtenido se almacenó en un envase de vidrio ámbar bajo refrigeración hasta su uso.

3.4.2. Aislamiento de compuestos fenólicos

- Se reconstituyó el extracto hidroalcohólico seco con agua destilada y se trató con éter de petróleo para eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que posiblemente interfieran en la extracción de los compuestos fenólicos de interés.
- Se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y se evaporó a sequedad para obtener finalmente la fracción flavónica.¹⁷

3.4.3. Pruebas cualitativas

0,25 g de extracto seco se reconstituyó con 4 mL de etanol de 96% y se distribuyó en dos tubos de ensayo para las reacciones de coloración.

a. Prueba de Shinoda

- Se incorporó partículas de magnesio sobre la fracción de acetato de etilo contenida en un tubo de ensayo, luego se añadió gotas de ácido clorhídrico por las paredes del tubo. La aparición de tonos rojos se consideró como reacción positiva para flavonoides.

b. Reactivo de cloruro férrico

- Se le añadió unas gotas de cloruro férrico al 10%, sobre la fracción de acetato de etilo contenida en un tubo de ensayo. La aparición de tonos azul negruzcos se consideró como reacción positiva para compuestos fenólicos.

3.4.4. Caracterización cromatográfica de los compuestos fenólicos

a. Cromatografía en capa fina (CCF)

- La fracción de acetato de etilo reconstituída remanente se concentró en un baño de agua hasta consistencia viscosa y sembró con capilares de vidrio en la base de placas cromatográficas de silicagel G de 20 x 20 cm.
- La placa se introdujo en una cubeta cromatográfica conteniendo la fase móvil acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial y agua (100:11:11:27), hasta que este alcance los dos centímetros del borde superior.
- La placa se retiró, secada bajo campana extractora y se observó bajo luz UV, en busca de fluorescencias características.¹⁷

b. Análisis espectral

- Las fluorescencias observadas en la placa cromatográfica bajo luz UV fueron separadas en frascos viales ámbar, reconstituidas con metanol y filtradas.
- Cada muestra obtenida fue leída en un espectrofotómetro Genesys 6 UV/VIS frente a un blanco de metanol.

3.4.5. Evaluación de la actividad gastroprotectora y antisecretora

3.4.6. Diseño experimental

El diseño empleado fue el diseño con postprueba únicamente y grupo de control.

Simbólicamente y de forma abreviada, corresponde a:

$$\begin{array}{ccc} RG_n & X_n & O_n \\ RG_c & -- & O_c \end{array}$$

Donde RG corresponde a los grupos experimentales organizados aleatoriamente, X, es el estímulo y O, la observación.¹⁸

3.4.7. Método de úlcera gástrica aguda inducida por etanol

Se usó el modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96% descrito por Hurtado⁴.

- Los animales fueron alojados en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación por una semana previa a los experimentos, con libre acceso a agua y alimento y con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad.
- Se emplearon 56 cobayos machos de la línea Perú adquiridos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), adultos, entre 400 y 500 g de peso. Los animales se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de comenzar el experimento, dejándolos únicamente con agua *ad libitum*.
- Para la producción de úlceras gástricas se utilizó etanol al 96% a la dosis de 1 mL/250 g, a dosis única.
- Como medicamentos se empleó omeprazol a dosis de 20 mg/kg y sucralfato a 3 mL/kg (1 g/5 mL → 600 mg/3 mL), única dosis para cada fármaco.
- Los tratamientos se administraron vía oral con la ayuda de una cánula orogástrica de metal, una hora antes de la administración del agente ulcerogénico (etanol 96%), según se detalla en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Distribución de grupos experimentales para evaluar la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.

Grupo	Repetición	Tratamiento	Vehículo y/o agente ulcerogénico
I	8	Suero fisiológico 1mL/250g	Suero fisiológico 1mL/250g
II	8	Suero fisiológico 1mL/250g	Etanol 96° 1mL/250 g
III	8	Omeprazol 20 mg/kg	Etanol 96° 1mL/250 g
IV	8	Sucralfato 3 mL/kg	Etanol 96° 1mL/250 g
V	8	<i>J. neotropica</i> 0,5 mg/kg	Etanol 96° 1mL/250 g
VI	8	<i>J. neotropica</i> 1,0 mg/kg	Etanol 96° 1mL/250 g
VII	8	<i>J. neotropica</i> 2,0 mg/kg	Etanol 96° 1mL/250 g

- Los animales fueron sacrificados seis horas después de la administración del etanol 96%, con una sobredosis de pentobarbital sódico (Halatal) de uso veterinario por vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó una laparotomía abdominal extrayendo los estómagos con cuidado. Para calificar las lesiones de la mucosa gástrica se consideraron las variables de edema y hemorragia, siendo calificados según la magnitud de la lesión observada. Los parámetros antes mencionados fueron medidos empleando la escala de puntaje observacional: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado y 3 = severo. Posteriormente extrayéndose los estómagos; con mucho cuidado se determinó el pH y se procedió a medir el volumen del contenido gástrica.
- El índice de lesiones promedio y porcentaje de inhibición de lesiones gástricas se calculó de acuerdo a las Escalas de Alada *et al.* modificada (**Tabla 2**) y la Escala de Marhuenda (**Tabla 3**).

Tabla 2. Escala de Alada *et al.* modificada.⁴

Puntaje	Característica
0	Normal
1	Leve (úlceras puntiformes < 1 mm o microhemorragias)
2	Moderada (2 o más úlceras hemorrágicas pequeñas)
3	Severa (úlceras grandes > 2 mm de diámetro)

Tabla 3. Escala de Marhuenda.⁴

Puntaje	Característica
0	Sin lesión.
1	Úlceras hemorrágicas finas y dispersas y de longitud menor de 2 mm.
2	Una úlcera hemorrágica de longitud menor a 2 mm.
3	Más de una úlcera de grado 2.
4	Una úlcera de longitud menor de 5 mm y diámetro menor de 2 mm.
5	De una a tres úlceras de grado 4.
6	De cuatro a cinco úlceras de grado 4.
7	Más de seis úlceras de grado 4.
8	Lesiones generalizadas de la mucosa con hemorragia

- Se calculó la puntuación total (la suma del puntaje total para todos los cobayos del mismo grupo) y el promedio de ambas escalas. El puntaje total se expresa en porcentaje de inhibición respecto al índice de lesión del grupo control:

$$\%Inhibición = \frac{P_{\text{medio del grupo control}} - P_{\text{medio del grupo patrón}}}{P_{\text{medio del grupo control}}} \times 100$$

P: puntaje obtenido en la evaluación macroscópica según escala.

- Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición respecto al índice de ulceración del grupo control.
- Para determinar el pH del contenido gástrico, luego de seis horas de la última administración, los animales fueron sacrificados, administrándoles por vía intraperitoneal pentobarbital 100 mg/kg. Mediante laparotomía se extrajo el estómago, que fue abierto por la curvatura mayor y se trasvasó el contenido gástrico a una probeta y seguidamente, con cuidado se midió el volumen del contenido gástrico, y para posterior se trasvasó a un vaso precipitado para la medición del pH, por medio de un pH metro marca waterpproof – Phep by HANNA.
- Para el análisis histopatológico, los estómagos fueron extirpados y lavados suavemente con solución salina para remover la sangre y los detritos adheridos al tejido; se los fijó las muestras en formol al 10% tamponado, por 7 días, y luego se seleccionó las zonas donde de acuerdo al examen macroscópico se evidenciaba lesión aparente. El procesamiento de los tacos

de parafina se realizó empleando un dispensador de parafina. Los tacos obtenidos fueron llevados a congelamiento a $< 0^{\circ}\text{C}$, por un lapso de 3 horas, para luego proceder al corte de 3μ de espesor con ayuda de un micrótomo. Luego, se retiró la parafina en una estufa, para proceder a la coloración con hematoxilina – eosina. Después de la deshidratación y limpieza de las láminas, fueron llevados para observación microscópica de características anómalas.

- Para determinar la dosis con mayor actividad gastroprotectora y antisecretora, se realizó mediante el puntaje total expresado en porcentaje de inhibición respecto al índice de lesión del grupo control y para determinar la actividad antisecretora, primeramente, se hizo análisis de varianza y posteriormente subconjunto homogéneo (HSD Tukey), se procesó con datos obtenidos por estadístico de medida de tendencia central (media).

3.5. Análisis estadístico

Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS (statistical package for social sciences), versión 24.0, año 2016. Se aplicaron el análisis de varianza (ANOVA). Se consideró significativa una $p < 0,05$, con intervalo de confianza al 95%. Se determinó la media y desviación estándar de los valores individuales obtenidos para los animales de cada grupo.

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Caracterización de los compuestos fenólicos con reactivo cloruro férrico 5% y ensayo de Shinoda presente en el extracto obtenido de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.

Metabolito Secundario	<i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en hojas.	Observaciones
Compuestos fenolicos	+++	Azul negruzco
Flavonoides	+++	Rojo

LEYENDA:
 (+) : Escaso
 (++) : Moderado
 (+++) : Abundante

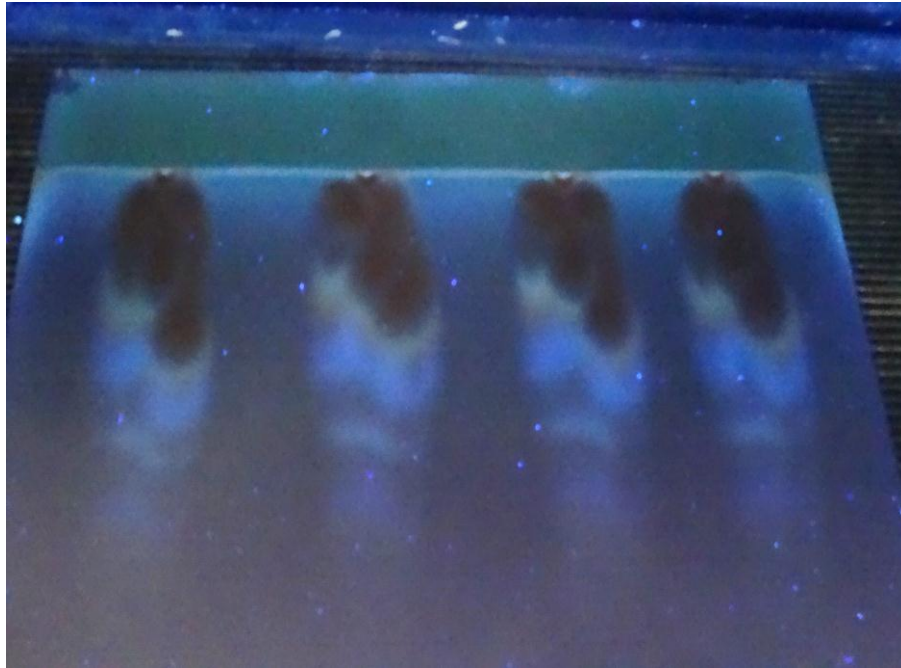
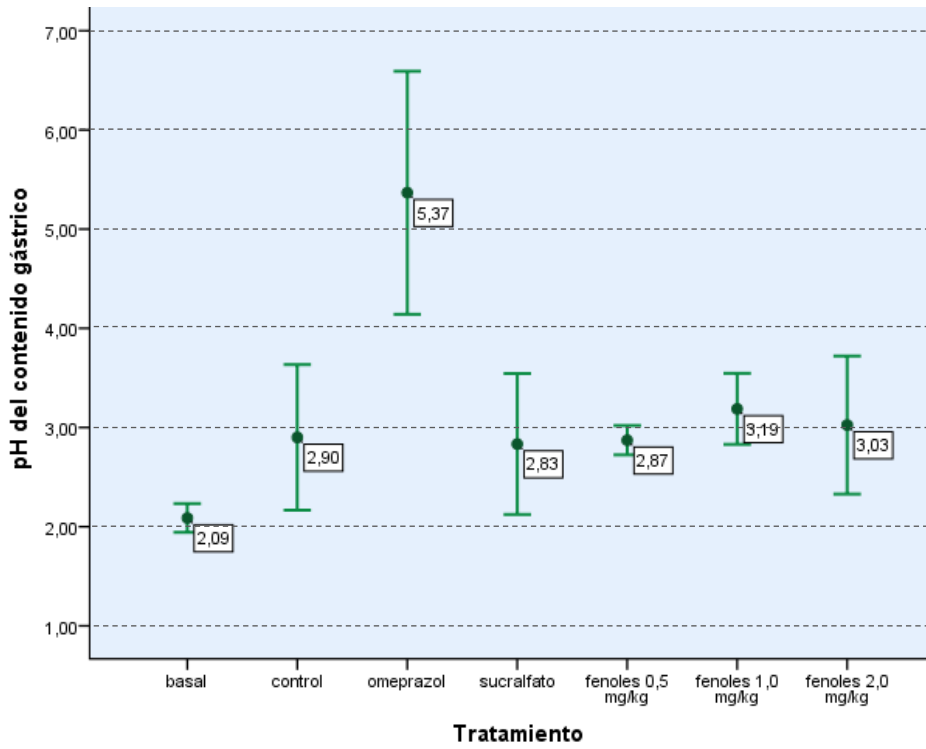
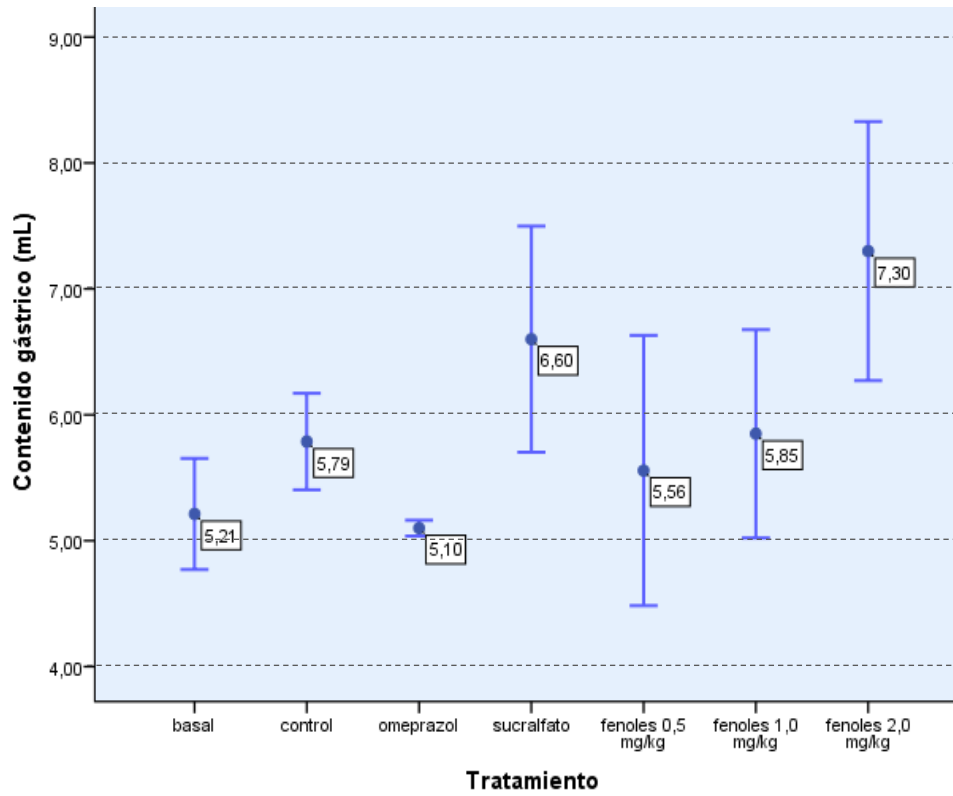


Figura 3. Análisis cromatográfica del extracto de acetato de etilo bajo luz UV contenido de los compuestos fenólicos. Ayacucho 2017.



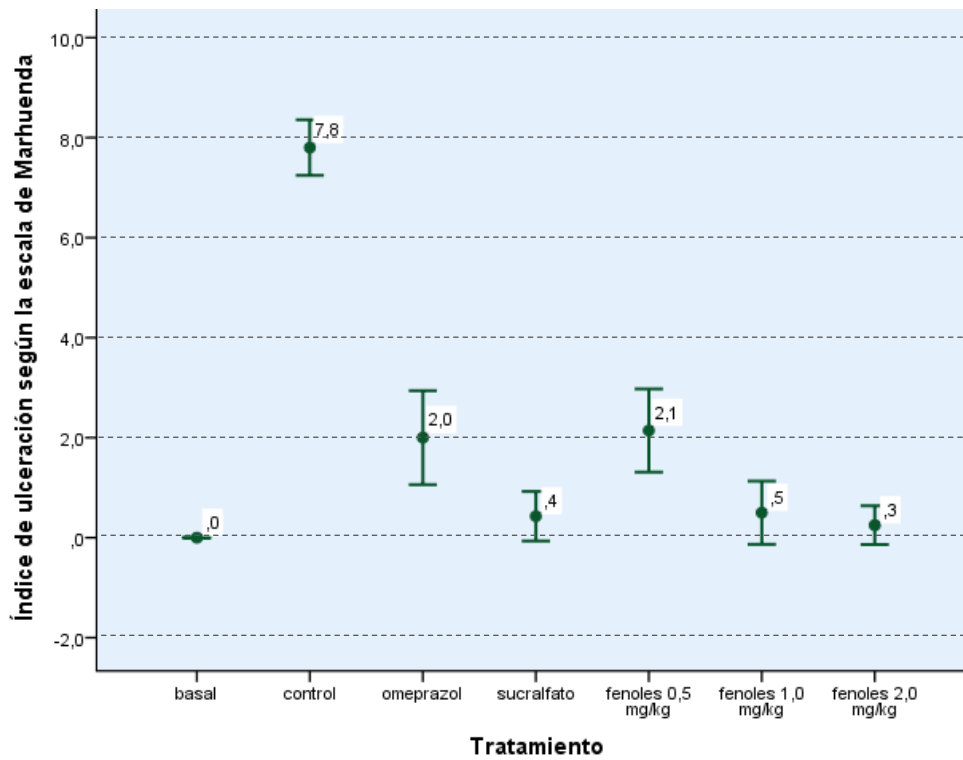
p = 0,960

Figura 4. pH del contenido gástrico en los grupos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.



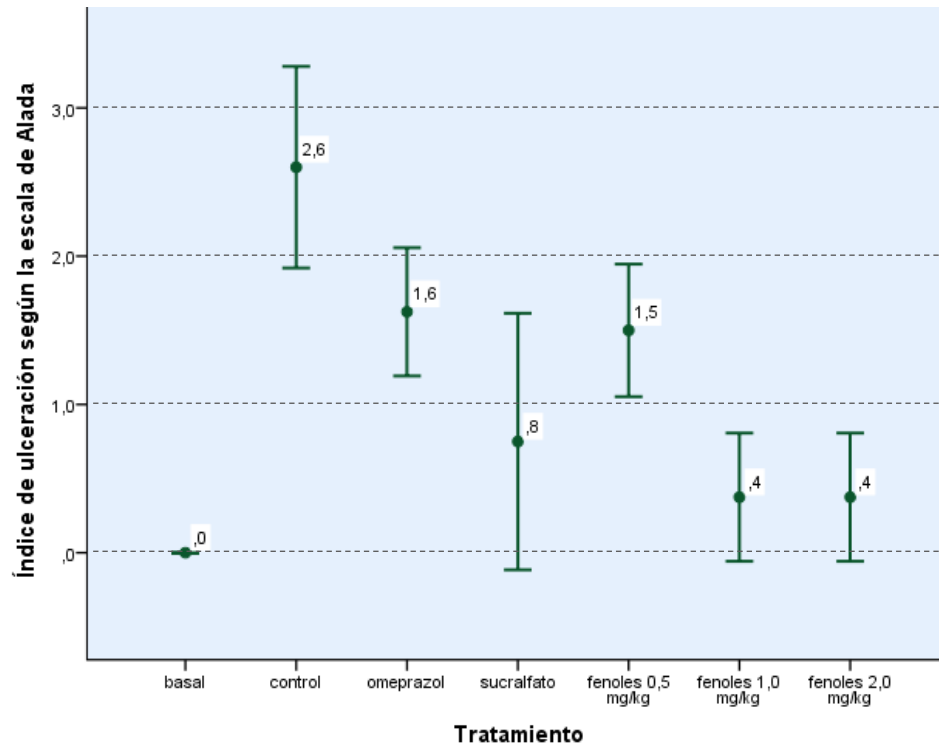
$p = 0,007$

Figura 5. Contenido gástrico de los grupos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.



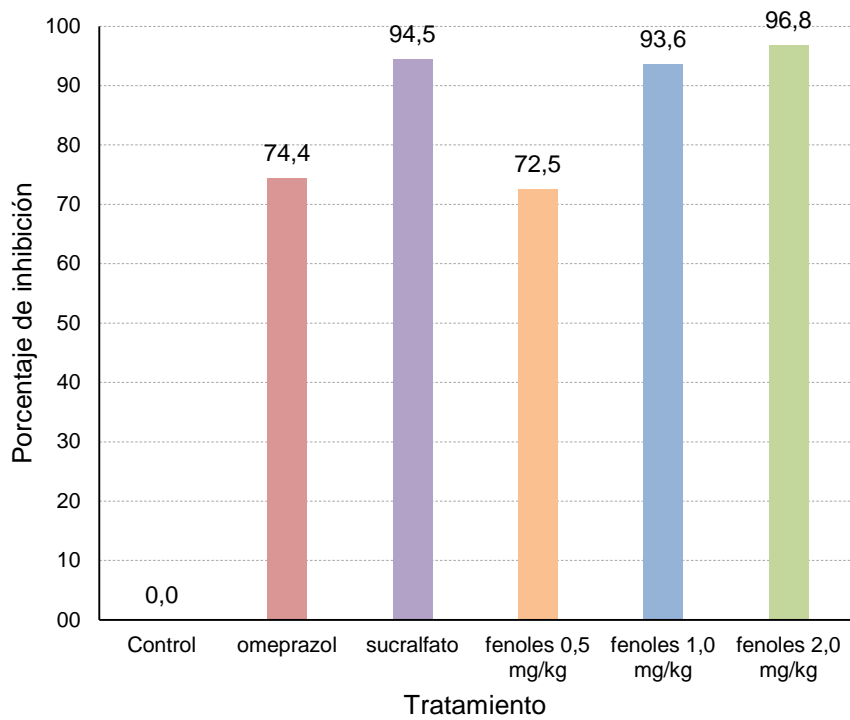
p = 0,000

Figura 6. Índice de ulceración gástrica según la escala de Marhuenda observado en los tratamientos: basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.



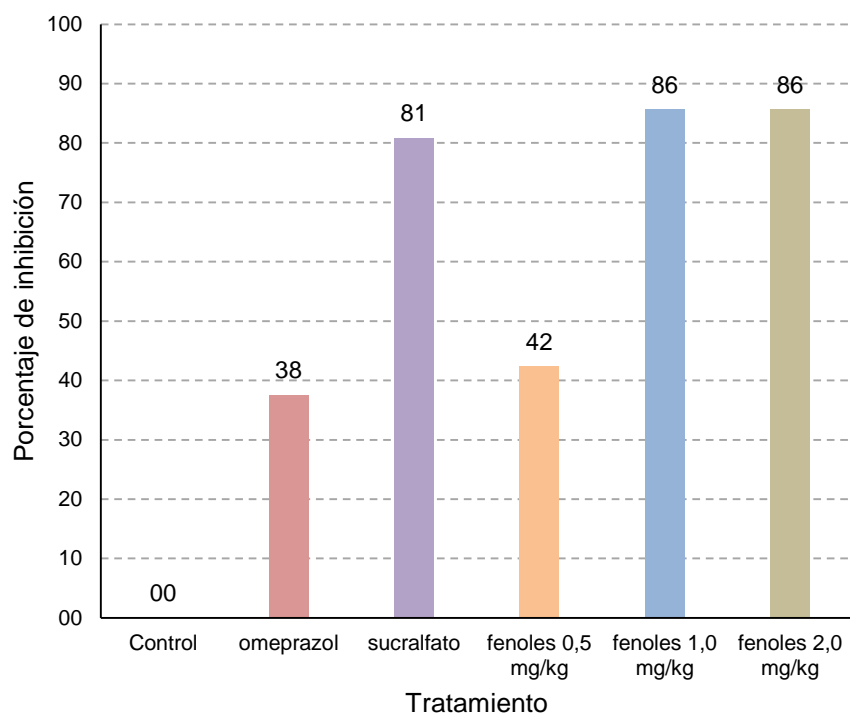
p = 0,001

Figura 7. Índice de ulceración gástrica según la escala de Alada observado en los tratamientos: basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.



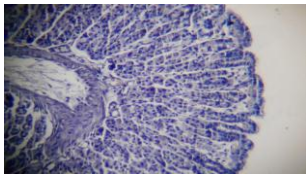
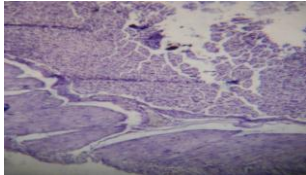
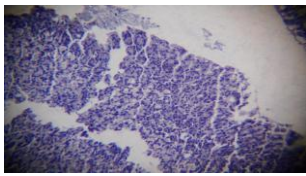
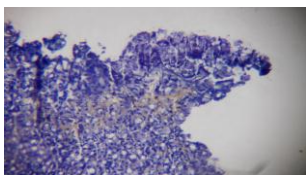
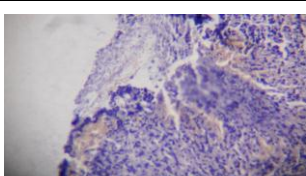
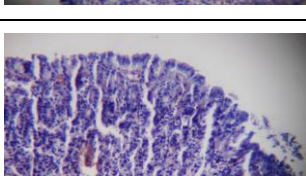
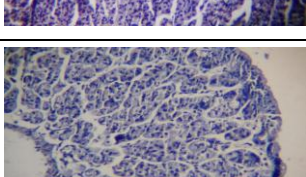
$p = 0,000$

Figura 8. Porcentaje de inhibición de ulceración gástrica, según la escala de Maruenda, mostrado por los tratamientos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.



p = 0,001

Figura 9. Porcentaje de inhibición de ulceración gástrica, según la escala de Alada, mostrado por los tratamientos basal, control, fármacos y compuestos fenólicos aislados, a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.

Grupo	Corte	Observación
blanco		Se observa la conservación de la citoarquitectura del tejido gástrico.
control		Se observa pérdida de la mucosa, evidente zona erosiva superficial de epitelio y edema que alcanza la muscular de la mucosa.
omeprazol		Se observa zona erosiva superficial de epitelio de leve a moderada y edema.
sucralfato		Se observa discreta erosión superficial de epitelio.
0,5mg/kg		Se observa leve erosión superficial de epitelio y moco.
1,0mg/kg		Se observa una discreta erosión superficial.
2mg/kg		Discreto edema.

Fuente: Laboratorio de patología del Dr. Solís.

Todos los análisis histopatológicos se procesaron con la técnica de hematoxilina - eosina.

Figura 10. Análisis de los cortes histológicos de estómago. Ayacucho 2017.

V. DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos se presentan como metabolitos secundarios y están ampliamente distribuidos en las plantas desde las raíces hasta las semillas. Éstos son extensos en naturaleza y gama, de estructuras simples, con un anillo aromático a las sustancias poliméricas altamente complejas tales como taninos y lignines.¹⁵

Respecto a la extracción, la solubilidad de los compuestos fenólicos se rige por el tipo de disolvente (polaridad) utilizado, el grado de polimerización de los compuestos fenólicos, así como la interacción de compuestos fenólicos con otros constituyentes de los alimentos y la formación de complejos insolubles. Por lo tanto, no existe un procedimiento uniforme o completamente satisfactorio que sea adecuado para la extracción de todos los compuestos fenólicos o una clase específica de sustancias fenólicas en materiales vegetales. Metanol, etanol, acetona, agua, acetato de etilo y, en menor medida, propanol, dimetilformamida, y sus combinaciones se utilizan con frecuencia para la extracción de compuestos fenólicos.¹⁹ Considerando este aspecto, elegimos el etanol como solvente de extracción de fenoles de las hojas de “nogal”, dado su fácil acceso, además de que, a decir de Miranda y Cuéllar²⁰, los extractos hidroalcohólicos son los que extraen la mayor diversidad de componentes químicos presentes en drogas, donde la concentración de principios activos es óptima, facilitando la dosificación de los mismos.

De otro lado, en la extracción líquido – líquido de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico, resulta eficaz el uso de acetato de etilo dos veces, juntando las fases orgánicas de cada caso, donde se encuentra gran cantidad de fenoles libres.²¹ Este hecho fue evidenciado mediante pruebas preliminares de identificación cualitativa, las mismas que dieron positivo, como se muestra en el Tabla 4 y Anexo 2. A su vez, el análisis cromatográfica del extracto de acetato de etilo bajo luz UV, como se ve en la Figura 3 y Anexo 3, puso en evidencia

fluorescencias color amarillo, violeta, verde y marrón, típicos de compuestos fenólicos, los mismos que, luego de una lectura espectral en el rango de 200 a 400 nm, muestran picos de máximas absorbancias (Anexo 4) que podrían corresponder a ácidos fenólicos o flavonoides, metabolitos que son reportados ampliamente por otros autores.²²

Para la evaluación de la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” hemos empleado el modelo de úlcera gástrica aguda inducida con etanol al 96% en cobayos. La ciencia de los animales de laboratorio ha alcanzado un alto nivel de desarrollo con el fin de lograr un trato humanitario a los animales y mejorar la calidad de las investigaciones. A pesar de contar con modelos alternativos, existen pruebas para las cuales continúan siendo insustituibles. En efecto, los cobayos son modelos de estudios inmunológicos, farmacológicos y nutricionales.²³

En la Figura 4, luego de realizado el experimento, se puede apreciar la variación de pH del contenido gástrico en los grupos basal, control, fármacos de referencia y compuestos fenólicos a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. El pH del grupo que sólo recibió el vehículo, suero fisiológico 1mL/250 g, no muestra variación alguna, habiéndose registrado una media de 2,09, que es la acidez normal o basal. El grupo control, que recibió etanol absoluto como agente ulcerogénico y sin ningún tratamiento adicional, manifestó ligera reducción del pH del contenido gástrico alcanzando una media de 2,9. En contraste, es muy evidente el efecto inhibitor de la bomba de protones que ejerce el fármaco de referencia omeprazol con el consecuente descenso del pH que, para este grupo, alcanzó una media de 5,37. El fármaco sucralfato, del mismo modo, al no ser un antiácido propiamente dicho, al parecer ha ejercido su mecanismo de acción con la conservación del pH en 2,83, verificable únicamente con el estudio histológico realizado. Los compuestos fenólicos administrados a las dosis de 0,5; 1,0 y 2,0 mg/kg al parecer no han ejercido actividad a nivel del pH gástrico ya que las medias de este valor son estadísticamente similares con el grupo basal (Anexo 9). Este hecho podría deberse a que, dentro de los compuestos fenólicos ensayados, las moléculas sean otras diferentes al ácido cafeico, ferúlico, p-coumárico y cinámico. Un estudio, se observó que el tratamiento con dosis de 50 y 250 mg/kg de ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico y cinámico y controles positivos (omeprazol o

cimetidina) disminuyó significativamente el índice de lesión, el área total de la lesión y el porcentaje de lesión en comparación con los grupos de control negativo. Además, el porcentaje de inhibición de la úlcera fue significativamente mayor en los grupos tratados con los diferentes ácidos fenólicos, cimetidina u omeprazol, en todos los protocolos utilizados, en comparación con los grupos de control negativo. En el modelo para determinar la secreción gástrica, el uso de píloro ligado, el tratamiento con ácidos fenólicos y cimetidina redujo el volumen de jugo gástrico y la acidez total y aumentó significativamente el pH gástrico ($p < 0,05$), en comparación con el grupo control. En el grupo tratado con 50 mg/kg de ácido p-cumárico no se observó diferencia significativa, en comparación con el control.²⁴ Otro estudio también informa de los ácidos fenólicos como gastroprotectores. *Curcuma amada*, comúnmente conocido como mango jengibre, actuó como potente inhibidor de la bomba de protones y del crecimiento de *H. pylori*. Los fenoles libres y ligados del jengibre (ácidos cafeico 26%, gentísico 24%, férulico 20%, gálico 10%, cinámico 7% y protocatequídico 7%, ferúlico 47%, ácido cinámico 29%, ácido p-cumárico 11% y ácido jerárquico 5%) inhibieron la bomba de protones mostrando una potencia 9 a 27 veces mayor que el lanzoprazol.²⁵

También un estudio ha confirmado que el tratamiento con quercetina disminuyó significativamente el número de mastocitos y redujo el área de erosiones gástricas. Los resultados sugieren que el efecto gastroprotector de la quercetina en este modelo experimental puede deberse a sus efectos antiperoxidativos, antioxidantes y antihistamínicos.^{26, 27}

En la Figura 5, se observa la variación del volumen gástrico en los grupos basal, control, fármacos de referencia y compuestos fenólicos a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. Considerando que los animales se mantuvieron sin alimento y sólo con *agua ad libitum*, el volumen del contenido gástrico de referencia en el grupo blanco fue de una media de 5,21 mL, aun cuando este sólo recibió el vehículo suero fisiológico 1mL/250g. El grupo control prácticamente mostró volúmenes similares al grupo blanco con una media de 5,79 mL, lo mismo que el fármaco de referencia omeprazol con una media de 5,10 mL. Los grupos tratados con sucralfato y con compuestos fenólicos a 2,0 mg/kg, mostraron incrementos de volumen estadísticamente similares, con 6,60 y 7,30 mL, respectivamente y además diferentes del grupo control. Es evidente que el incremento del volumen del contenido gástrico se

debió a la estimulación, por algún mecanismo, de la producción de moco. Las dosis de 0,5 y 1,0 mg/kg no mostraron cambios significativos del volumen de contenido gástrico ya que sus volúmenes de 5,56 y 5,85 mL, respectivamente, son estadísticamente similares al control (5,79 mL), e incluso al basal (5,21 mL) (Anexo 9). Este incremento de moco, obviamente, ha ejercido una acción protectora de la mucosa gástrica frente al agente ulcerogénico. En vista de esto, podríamos afirmar que los fenoles a 1,0 y 2,0 mg/kg tuvieron una acción tipo sucralfato. El sucralfato, además de su efecto formador de barreras, parece que provoca otros efectos protectores sobre la mucosa gástrica. Adsorbe la bilis y disminuye la absorción de algunos ácidos biliares, tiene un efecto trófico sobre la mucosa gástrica, incrementa el flujo sanguíneo mucoso y previene los lesivos sobre la microcirculación, facilita la acumulación de factores de crecimiento en las zonas lesionadas de la mucosa gástrica, activa los macrófagos localizados en la mucosa facilitando su participación en la formación de tejido de granulación en las zonas lesionadas, incrementa la formación de factores endógenos protectores de la mucosa como el NO o algunas prostaglandinas y, por último, estimula la secreción de bicarbonato y moco por la mucosa gástrica.²⁸

Para la valoración del daño gástrico hemos empleado dos herramientas estandarizadas, la de Marhuenda, que es más específica en su escala valorativa, y la de Alada *et al* modificada, menos específica.

La Figura 6, corresponde al índice de ulceración gástrica según la escala de Marhuenda observado en los tratamientos: basal, control, fármacos y compuestos fenólicos a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. Se observa que el grupo control, que únicamente recibió el agente ulcerogénico, sin ningún tratamiento adicional, ha alcanzado valoraciones de lesión gástrica de hasta 7,8 puntos, lo que corresponde a más de seis úlceras de grado 4, según dicha escala. Con omeprazol, es evidente la protección de la mucosa gástrica debido a la reducción del pH mostrado en la Figura 4, con un índice de ulceración de dos puntos (una úlcera hemorrágica de longitud menor a 2 mm.), similar al tratamiento con 0,5 mg/kg de fenoles (2,1 puntos) e incluso al grupo control. En contraste, los tratamientos con sucralfato, fenoles a 1,0 y 2,0 mg/kg, alcanzaron 0,4; 0,5 y 0,3 puntos, respectivamente. Estas dos últimas puntuaciones resultaron ser estadísticamente similares (Anexo 10).

La Figura 7, corresponde al índice de ulceración gástrica según la escala de

Alada *et al* modificada observado en los tratamientos: basal, control, fármacos y compuestos fenólicos a diferentes dosis, de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. Si observamos con detenimiento, es fácil deducir la misma respuesta observada en la Figura 6, es decir, existe concordancia entre ambas escalas. Los índices de ulceración gástrica, tanto medidos con la escala de Marhuenda y Alada *et al* modificada, expresados como valores porcentuales se muestran en las Figuras 8 y 9. Evidentemente, resaltan los porcentajes más altos que corresponden a los fármacos de referencia, omeprazol y sucralfato, y a los compuestos fenólicos a 1,0 y 2,0 mg/kg. Según la escala de Marhuenda, todos los tratamientos lograron porcentajes de inhibición de ulceración gástrica mayores a 70%, resultando más importantes los compuestos fenólicos a 1,0 y 2,0 mg/kg, con 93,6 y 96,8%, respectivamente, lo que demuestra, pues, su actividad gastroprotectora. Resultados muy similares se encontraron tras la evaluación mediante la escala de Alada *et al*. Por otro lado, En la evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Que empleó el modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96°, administrando el extracto a dosis de 50, 250 y 500 mg/kg, omeprazol 20 mg/kg y sucralfato 3 mL/kg. La evaluación macroscópica fue mediante la escala de Alada *et al*. modificada y la de Marhuenda. En los estudios del extracto dio positivo para carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, triterpenos, esteroides, saponinas y alcaloides. La cuantificación del compuesto fenólico mayoritario fue de $16,909 \pm 0,382$ mg EAG/g del extracto seco. El tratamiento con el extracto produjo una inhibición de las úlceras gástricas de 84,61% y 94,77% a dosis de 250 y 500 mg/kg respectivamente con un $p < 0,05$.⁴ En tanto, respecto a la actividad antsecretora de los compuestos fenólicos, no se apreció ninguna actividad significativa, es decir, al parecer no hubo antagonismo de receptores H₂ o inhibición de la bomba de protones, por lo que los niveles de pH, después del tratamiento (Figura 4), no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al grupo control (Anexo 8).

Para la verificación mucho más objetiva del grado de protección gástrica de los tratamientos, se llevó a cabo el análisis histopatológico del tejido gástrico de cada cobayo. La Figura 10, muestra una fotografía de cada corte histológicos de una muestra representativa de cada grupo. Como era de suponerse, en el grupo control hubo pérdida de la mucosa, con evidentes zonas erosivas y edema que

alcanza discretamente la muscular de la mucosa. Con los fármacos, obviamente, la protección fue buena, tal es así que con omeprazol sólo hubo erosión superficial de epitelio, es decir, de leve a moderado y con sucralfato discreto erosión superficial de epitelio. Con los compuestos fenólicos se puede evidenciar protección gástrica de manera dosis dependiente: a mayor dosis mayor efecto, siendo la mejor dosis la de 2,0 mg/kg, donde histológicamente sólo se observó discreto edema. Dicho sea de paso, en los estudios histopatológicos se observaron descamaciones y aumento de macrófagos en el grupo control, mientras que el grupo G (nogal 500 mg/kg) presentó mayor protección que en los grupos de 50 y 250 mg/kg, donde se observaron solo descamación e hipertrofia, de este estudio se concluyó que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” fue efectivo como agente gastroprotector en un modelo de inducción de úlceras gástricas por etanol 96%.⁴

Aun cuando hayamos tenido buenos resultados con los compuestos fenólicos, queda la duda sobre el mecanismo de acción exacta y cómo es que se relacionan con ella. Muchos de los compuestos fenólicos actúan a través de diferentes mecanismos y exhiben actividad antiulcerogénica. Estudios reportan sobre los compuestos fenólicos que las relaciones estructura-actividad muestran que la presencia de un grupo hidroxilo en C-5 y C-7 dentro de las flavonas disminuye drásticamente su actividad gastroprotectora. Sin embargo, un grupo metoxilo en la posición C-7 parece mejorar la gastroprotección. Un doble enlace en C-2 y C-3 y un anillo intacto parecen necesarios para la actividad óptima. Se informó que una sustitución con un grupo metoxilo en diferentes posiciones dentro del núcleo de flavona, tal como la posición C-5 o C-7, o una sustitución de metilo en la posición C-7, no afecta la potencia de la actividad gastroprotectora. Sin embargo, la sustitución con un grupo metoxilo o hidroxilo en las posiciones C-3, C-6 o C-8 reduce la actividad gastroprotectora de los compuestos.²⁹

Todos los resultados obtenidos en este trabajo dan sustento a la conclusión de que los fenoles aislados de *Juglans neotropica* Diels. “nogal” tienen actividad gastroprotectora en cobayos. Sin embargo, se requieren de estudios más minuciosos para precisar mejor dicha actividad.

VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels. “nogal”, tienen actividad gastroprotectora en “cobayos”, en el modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96%, pero no tienen actividad antisecretora.
2. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels. “nogal”, no tienen actividad antisecretora en “cobayos”, en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96%, siendo los valores de pH y volumen de contenido gástrico estadísticamente similares respecto al grupo control ($p = 0,960$).
3. Se identificó la presencia de los compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto obtenida de las hojas de *Juglans neotropica* Diels. “nogal”, las cuales se evidenciaron con el reactivo de cloruro férrico al 5% y ensayo de Shinoda.
4. En el análisis cromatográfica del extracto de acetato de etilo bajo luz UV se llegó a caracterizar los compuestos fenólicos, las cuales se evidenciaron por las fluorescencias color amarillo, violeta, verde y marrón. Y en la lectura espectral de rango 200 – 400 nm, se mostraron picos de máximas absorbancias que podrían corresponder a ácidos fenólicos o flavonoides.
5. En el estudio histopatológico de los tejidos gástricos extirpados utilizando la técnica de hematoxilina – eosina, en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96%, siendo así, es concordante con los que recibieron la dosis 2,0 mg/kg de compuestos fenólicos, sólo se han visto discreto edema.
6. La dosis con mayor actividad gastroprotectora de los compuestos fenólicos en “cobayos”, en un modelo de úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96%, es la de 2,0 mg/kg con porcentaje de inhibición de 96,8% e índice de

ulceración media de 0,3, estadísticamente diferente al grupo control ($p = 0,000$).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios farmacológicos *in vivo* que demuestren con mayor precisión la actividad gastroprotectora de los fenoles de aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.
2. Elucidar la estructura química de los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” y ensayar su actividad gastroprotectora.
3. Desarrollar formas farmacéuticas a base de los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” y evaluar su actividad gastroprotectora.
4. Realizar estudios de toxicidad de los compuestos fenoles de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.
5. Realizar análisis histopatológico del tejido gástrico en el modelo experimental de úlcera gástrica aguda inducida por etanol 96% en cobayos raza Perú.
6. Validar las escalas de la evolución macroscópica de lesiones gástricas con análisis histopatológica, en cobayos raza Perú.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bucciarelli A y Skliar MI. Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora. *Ars Pharmaceutica*. [Revista en internet] 2007 [acceso 2017-1-7]; 48(4):361-369. Disponible en: <http://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/4999>
2. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Madrid: Editorial Acribia S.A.; 1991.
3. Bucciarelli A, Mancini MDLM, Skliar M. Propiedades gastropotectoras de plantas medicinales. Estudios fitoquímicos y farmacológicos. *Rev. Asoc. Med. Bahía Blanca*. [Revista en internet] 2007 [acceso 2017-1-7]; 17(1):3-9. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962000000100008
4. Hurtado MPE. Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "Nogal peruano". [Tesis de Grado] Lima: UNMSM: Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014
5. Aguedo J, Tinco L, Rios F, Bonilla P, Arroyo J. Efecto gastroprotector de los flavonoides del extracto etanólico de las partes aéreas de *Satureja sericea* (goyal). *Ciencia e Investigación*. [Revista en internet] 2008 [acceso 2017-1-7]; 11(2):35-45. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/5008>.
6. Juro S, Flores V, Mendoza Y, Del Carpio C. Efecto cicatrizante de las diferentes formas farmacéuticas tópicas elaboradas con el extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" en ratones albinos. *Folia dermatol Perú*. [Revista en internet] 2010 [acceso 2017-1-7]; 21(1):19-24. Disponible en: <http://www.cidermperu.org/fovia/pdf/f0234.pdf>
7. Palomino M, Human O, Béjar E, Jurado B, Palomino C. evaluación gastroprotectora del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Guilleminea densa* (Hum, Bonpl. Ex Willd.) Moq. (sanguinaria) en úlceras inducidas con etanol. *Académica Salud. Perú*. [Revista en Internet] 2010 [acceso 2017-1-7]; 17(2): 55-60. Disponible en: http://sisbid.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rev_academia/2010_n2/pdf/a13v17n2.pdf
8. Hurtado P, Jurado B, Ramos E, Calixto M. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de las hojas de *Juglans neotropica* Diels (nogal peruano). *Sociedad Química. Perú*. [Revista en internet] 2015 [acceso 2017-1-7]; 81(3): 283-291. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n3/a10v81n3.pdf>
9. Quiroz MRE. Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base de los extractos de nogal (*Juglans neotropica* Diels), ortiga (*Urtica dioica* L.), sábila (*Aloe vera*), en ratones (*mus musculus*). [Tesis de Grado] Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: Facultad de Ciencias de Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2013. [acceso 2017-1-7]; Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/2568/1/56T010335.pdf>
10. Gibaja Oviedo S. Pigmentos naturales quinónicos. Fondo Editorial UNMSM Lima, 1998.
11. Harrison. Principios de medicina interna. 17ª edición. México: Editorial Mc Graw Hill; 2008.
12. Matarama M. Medicina interna, diagnóstico y tratamiento. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.; 2005
13. Turner JR. Tubo digestivo. En Kumar V, Abbas B, Fausto N, Aster J. Robbins, Patología estructural y funcional. 8ª Edición. Madrid: Elsevier; 2010.

14. McPhee S, Lingappa V, Ganong W. Fisiopatología médica, una introducción a la medicina clínica. México: Editorial Manual Moderno; 2006.
15. Sumbul S, Ahmad MA, Asif M y Akhtar M. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. [Revista en internet] 2011 [acceso 2017-1-7]; 3(3):361. Disponible en: <http://www.jpbonline.org/article.asp?issn=0975-7406;year=2011;volume=3;issue=3;spage=361;epage=367>
16. Evans W. Farmacognosia. 4ª edición. México: Editorial Interamericana McGraw Hill; 1991.
17. Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante y antirradicalaria. [Tesis de Maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
18. Hernández S, Fernández C, Baptista L. Metodología de la investigación. 4ª Edición. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2006.
19. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatogr A. [Internet]. 2004 [citado 19 de julio de 2017];1054(1-2):95-111. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304014098>
20. Miranda M CA. Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000.
21. Cabrera-Soto ML, Salinas-Moreno Y, Velázquez-Cardelas GA, Espinosa Trujillo E. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. Agrociencia [Internet]. 2009 [citado 19 de julio de 2017]; 43(8). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=30215547005>
22. Aranda-Ventura J, Vallejo JV, Sotero DG, Solís VS, Torres DV, Temmerman ÚM, et al. Toxicidad, actividad antioxidante in vitro e hipoglicemiante in vitro e in vivo del extracto acuoso de Juglans neotropica Diels (nogal peruano). Rev Peru Med Integrativa [Internet]. 21 de febrero de 2017 [citado 19 de julio de 2017];1(4). Disponible en: <http://rpm.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/37>
23. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. Biomedicina [Internet]. 2006 [citado 19 de julio de 2017]; 2(3):252-6. Disponible en: <http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-3/modelo.pdf>
24. Barros MP de, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos JK, et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. J Ethnopharmacol [Internet]. 8 de diciembre de 2008;120(3):372-7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874108004960>
25. Siddaraju MN, Dharmesh SM. Inhibition of Gastric H⁺, K⁺-ATPase and Helicobacter pylori Growth by Phenolic Antioxidants of Curcuma amada. J Agric Food Chem [Internet]. 1 de septiembre de 2007;55(18):7377-86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/jf070719r>
26. Kahraman A, Erkasap N, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. Toxicology [Internet]. 1 de febrero de 2003;183(1):133-42. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X02005140>
27. La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martín Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone,

- against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1 de julio de 2000;71(1):45-53. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874199001749>
28. Flórez J. *Farmacología Humana*. 3ª edición. Barcelona: Editorial Masson; 1997.
 29. Beserra FP, Rozza AL, Vieira AJ, Sérgio Gushiken LF, Pellizzon CH. Antiulcerogenic Compounds Isolated From Medicinal Plants. *Stud Nat Prod Chem* [Internet]. 1 de enero de 2016; 47:215-34. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444636034000061>

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación botánica del “nogal”. Ayacucho 2016.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE
“SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA”

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. Romel, HUACHACA LAURA,
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.
Dicha muestra ha sido estudiada y clasificada según el Sistema de Clasificación de
CRONQUIST. A. (1988), y es como sigue :

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	HAMAMELIDAE
ORDEN	:	JUGLANDALES
FAMILIA	:	JUGLANDACEAE
GENERO	:	Juglans
ESPECIE	:	<i>Juglans neotropica</i> Diels.
Nombre vulgar.	:	“nogal ”

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que
estime conveniente.

Ayacucho 08 de Setiembre del 2 016


Elga. Laura Aucastine Medina
JEFE

Anexo 2. Extracción e identificación cualitativa de los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.



a



B



c



D



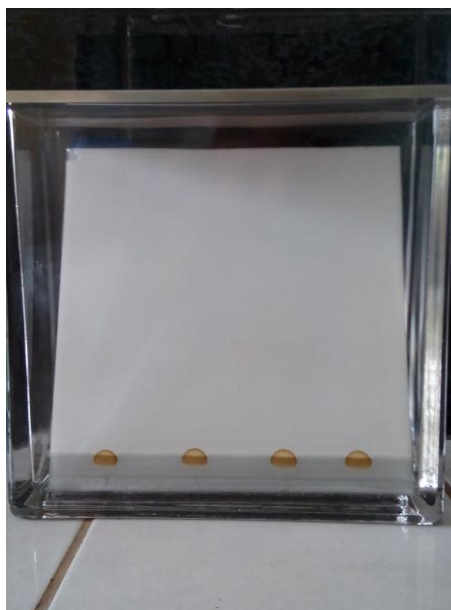
E

a, Muestra seca y molid; b, extracto hidroalcohólico; c, extracción líquido – líquido; d, concentración al vacío; e, reacciones de FeCl_3 (azul negruzco) y Shinoda (rojo).

Anexo 3. Separación cromatográfica de los compuestos fenólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.



a



B



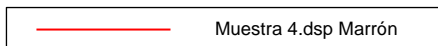
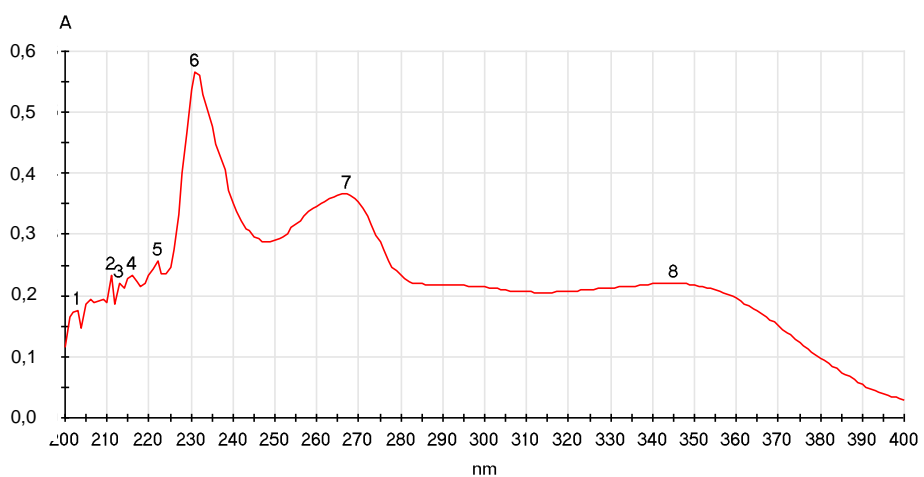
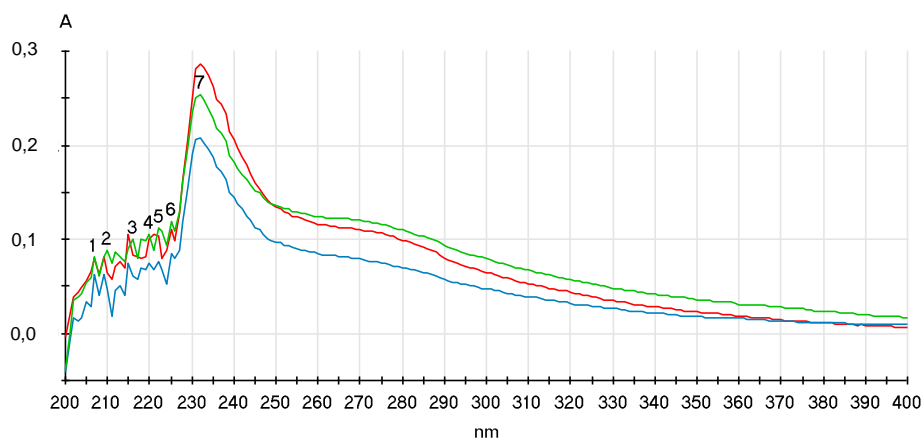
c



D

a, placa cromatográfica conteniendo muestras de extracto de acetato de etilo por cuadruplicado; **b**, cubeta cromatográfica conteniendo sistema de solventes y placa con muestra; **c**, placa con muestras separadas, y **d**, fluorescencias vistas bajo luz UV.

Anexo 4. Gráfica de las lecturas espectrales realizado en el espectrofotómetro Genesis 6. UV/VIS de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.



Anexo 5. Etapas de la evaluación de la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” en cobayos. Ayacucho 2017.



a



B



c



D



e



F

a, administración de tratamientos; b, laparotomía; c, medición del volumen gástrico; d, medición del pH; e, valoración según las escalas de lesión, y f, conservación de los tejidos en formol.

Anexo 6. Matriz de variables de estudio. Ayacucho 2017.

Tratamiento	pH	Cont. Gástr. (mL)	Marhuenda	Alada
basal	2,4	5,2	0,0	0,0
basal	2,2	5,6	0,0	0,0
basal	2,1	5,3	0,0	0,0
basal	2,0	6,0	0,0	0,0
basal	1,9	4,9	0,0	0,0
basal	1,9	4,2	0,0	0,0
basal	2,0	5,1	0,0	0,0
basal	2,2	5,4	0,0	0,0
control	2,2	6,2	8,0	3,0
control	2,8	5,2	7,0	3,0
control	3,6	5,3	8,0	2,0
control	2,5	6,3	8,0	2,0
control	3,4	5,6	8,0	3,0
control		5,4		
control		6,2		
control		6,1		
omeprazol	5,6	5,0	3,0	2,0
omeprazol	4,8	5,1		2,0
omeprazol	5,7	5,2	3,0	2,0
omeprazol		5,1		1,0
omeprazol		5,1	2,0	2,0
omeprazol		5,1	2,0	1,0
omeprazol		5,0	1,0	1,0
omeprazol		5,2	1,0	2,0
sucralfato	2,5	7,2	0,0	0,0
sucralfato	2,4	6,2		1,0
sucralfato	3,6	5,7	1,0	1,0
sucralfato	2,3	8,0	1,0	1,0
sucralfato	3,8	6,5	0,0	0,0
sucralfato	2,4	6,0	0,0	0,0
sucralfato			0,0	0,0
sucralfato			1,0	1,0
fenoles 0,5 mg/kg	2,9	5,0	2,0	1,0
fenoles 0,5 mg/kg	2,7	5,3	3,0	2,0
fenoles 0,5 mg/kg	2,9	5,8		2,0
fenoles 0,5 mg/kg	2,8	5,0	1,0	1,0
fenoles 0,5 mg/kg	3,2	5,4	3,0	2,0
fenoles 0,5 mg/kg	2,8	4,4	2,0	1,0
fenoles 0,5 mg/kg	2,8	8,0	1,0	1,0

fenoles 0,5 mg/kg	-		3,0	2,0
fenoles 1,0 mg/kg	2,3	6,0	0,0	0,0
fenoles 1,0 mg/kg	3,3	5,1	1,0	1,0
fenoles 1,0 mg/kg	3,2	6,3	0,0	0,0
fenoles 1,0 mg/kg	3,2	6,0	2,0	1,0
fenoles 1,0 mg/kg	3,7		0,0	0,0
fenoles 1,0 mg/kg	2,9		0,0	0,0
fenoles 1,0 mg/kg	3,5		0,0	0,0
fenoles 1,0 mg/kg	3,4		1,0	1,0
fenoles 2,0 mg/kg	2,8	6,4	1,0	1,0
fenoles 2,0 mg/kg	2,8	8,0	1,0	1,0
fenoles 2,0 mg/kg	2,3	8,2	0,0	0,0
fenoles 2,0 mg/kg	2,2	6,5	0,0	0,0
fenoles 2,0 mg/kg	4,8	7,0	0,0	1,0
fenoles 2,0 mg/kg	2,9	9,0	0,0	0,0
fenoles 2,0 mg/kg	2,8	6,0	0,0	0,0
fenoles 2,0 mg/kg	3,6		0,0	0,0

Anexo 7. Porcentaje de inhibición de la ulceración según la escala de Marhuenda. Ayacucho 2017.

Tratamiento	Puntaje	Promedio	Inhibición (%)
Control	39	7,80	0,0
Omeprazol	12	2,00	74,4
Sucralfato	3	0,43	94,5
fenoles 0,5 mg/kg	15	2,14	72,5
fenoles 1,0 mg/kg	4	0,50	93,6
fenoles 2,0 mg/kg	2	0,25	96,8

Anexo 8. Porcentaje de inhibición de la ulceración según la escala de Alada *et al.* Ayacucho 2017.

Tratamiento	Puntaje	Promedio	Inhibición (%)
Control	13	2,600	0,0
omeprazol	13	1,625	37,5
sucralfato	4	0,500	80,8
fenoles 0,5 mg/kg	12	1,500	42,3
fenoles 1,0 mg/kg	3	0,375	85,6
fenoles 2,0 mg/kg	3	0,375	85,6

Anexo 9. Análisis de varianza y subconjuntos homogéneos (HSD Tukey) del pH y contenido gástrico (mL). Ayacucho 2017.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
pH	Entre grupos	24,065	6	4,011	14,262	,000
	Dentro de grupos	10,687	38	,281		
	Total	34,752	44			
Contenido gástrico (mL)	Entre grupos	26,455	6	4,409	7,717	,000
	Dentro de grupos	23,425	41	,571		
	Total	49,879	47			

pH (HSD Tukey ^{a,b})				
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Basal	8	2,0875		
Sucralfato	6	2,8333	2,8333	
fenoles 0,5 mg/kg	7	2,8714	2,8714	
Control	5	2,9000	2,9000	
fenoles 2,0 mg/kg	8	3,0250	3,0250	
fenoles 1,0 mg/kg	8		3,1875	
omeprazol	3			5,3667
Sig.		,065	,914	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,748.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados

Contenido gástrico (mL) (HSD Tukey ^{a,b})				
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
omeprazol	8	5,1000		
basal	8	5,2125		
fenoles 0,5 mg/kg	7	5,5571	5,5571	
control	8	5,7875	5,7875	
fenoles 1,0 mg/kg	4	5,8500	5,8500	
sucralfato	6		6,6000	6,6000
fenoles 2,0 mg/kg	7			7,3000
Sig.		,563	,191	,640

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,497.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media

c. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Anexo 10. Análisis de subconjuntos homogéneos (HSD Tukey) entre control y tratamiento de los variables dependientes pH y contenido gástrico (mL). Ayacucho 2017.

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
pH	control	basal	,30232	,129	-,1282	1,753
		omeprazol	,38729	,000	-3,671	-1,261
		sucralfato	,32112	1,00	-,9325	1,065
		fenoles 0,5 mg/kg	,31052	1,00	-,9376	,994
		fenoles 1,0 mg/kg	,30232	,960	-1,228	,6532
		fenoles 2,0 mg/kg	,30232	1,00	-1,065	,8157
Contenido gástrico (mL)	control	basal	,37793	,731	-,5963	1,746
		omeprazol	,37793	,543	-,4838	1,858
		sucralfato	,40821	,436	-2,077	,4527
		fenoles 0,5 mg/kg	,39120	,997	-,9821	1,442
		fenoles 1,0 mg/kg	,46287	1,00	-1,497	1,372
		fenoles 2,0 mg/kg	,39120	,007	-2,724	-,300

Anexo 11. ANOVA de Kruskal- Wallis y comparaciones múltiples del índice de ulceración según la escala de Marhuenda y Alada *et al.* Ayacucho 2017.

Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
La distribución del índice de ulceración según la escala de Marhuenda es la misma entre las categorías de tratamiento.	Prueba de Kruskal – Wallis para muestras independientes	0,000	Rechazar la hipótesis nula
La distribución del índice de ulceración según la escala de Alada es la misma entre las categorías de tratamiento.	Prueba de Kruskal – Wallis para muestras independientes	0,000	Rechazar la hipótesis nula

Muestra 1 - Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajust.
Marhuenda					
Fenoles 2,0mg/kg – fenoles 1,0mg/kg	1,625	3,956	0,411	0,681	1,000
Fenoles 2,0mg/kg – fenoles 0,5mg/kg	10,875	4,095	2,656	0,008	0,048
Fenoles 2,0mg/kg – control	17,875	4,511	3,963	0,000	0,000
Fenoles 1,0mg/kg – fenoles 0,5mg/kg	9,250	4,095	2,259	0,024	0,143
Fenoles 1,0mg/kg – control	16,250	4,511	3,602	0,000	0,002
Fenoles 0,5mg/kg – control	7,000	4,633	1,511	0,131	0,785
Alada					
Fenoles 1,0mg/kg – fenoles 2,0mg/kg	0,000	4,059	0,000	1,000	1,000
Fenoles 1,0mg/kg – fenoles 0,5mg/kg	10,250	4,059	2,525	0,012	0,069
Fenoles 1,0mg/kg – control	16,950	4,268	3,662	0,000	0,001
Fenoles 2,0mg/kg – fenoles 0,5mg/kg	10,250	4,059	2,525	0,012	0,069
Fenoles 2,0mg/kg – control	16,950	4,628	3,662	0,000	0,001
Fenoles 0,5mg/kg – control	6,700	4,628	1,448	0,148	0,886

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significancia es de 0,05. Los valores de significación se han ajustado con la corrección Bonferroni en varias pruebas.

Anexo 12. Matriz de consistencia. Ayacucho 2016.

TÍTULO: Actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho 2017.

Autor: ROMEL HUACHACA LAURA

Problema	Objetivos	Hipótesis	Marco teórico	Variables	Metodología
¿Tendrán actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos?	<p>General: Evaluar la actividad gastroprotectora y antisecretora de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” en cobayos a diferentes dosis.</p> <p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto obtenido de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels. • Caracterizar cromatográficamente los compuestos fenólicos aislados. • Realizar el estudio histopatológico de los tejidos gástricos extirpados. • Determinar la dosis con mayor actividad gastroprotectora y antisecretora. 	Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” tienen actividad gastroprotectora y antisecretora en cobayos.	Antecedentes del estudio Aspectos botánicos de <i>Juglans neotropica</i> Diels. “nogal” Úlcera péptica Patogenia de la úlcera gástrica Compuestos fenólicos con actividad gastroprotectora y antisecretora.	<p>Independiente: Compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” Indicador: Dosis de 0,5; 1,0 y 2,0 mg/kg.</p> <p>Dependiente: Actividad gastroprotectora y antisecretora Indicador: Porcentaje de inhibición ulcerogénica, pH y volumen del contenido gástrico.</p>	<p>Tipo de investigación Básica – experimental.</p> <p>Población Hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal” que crece en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga a 2750 msnm.</p> <p>Muestra 3 kg de hojas frescas de <i>Juglans neotropica</i> Diels “nogal”.</p> <p>Animales de experimentación 56 cobayos machos de la línea Perú adquiridos del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), adultos entre 400 - 500 g de peso.</p> <p>Obtención del extracto hidroalcohólico Aislamiento de compuestos fenólicos Evaluación de la actividad gastroprotectora y antisecretora en cobayos. Se empleará el modelo experimental descrito por Hurtado, con algunas modificaciones.</p> <p>Análisis de datos Los datos serán procesados utilizando el paquete estadístico SPSS (stadistical package for social sciences), versión 24.0, año 2016. Se aplicará el análisis de varianza (ANOVA). Se considera significativa una $p < 0,05$, con intervalo de confianza al 95%. Se determinará la media y desviación estándar de los valores individuales obtenidos para los animales de cada grupo.</p>