

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA**



**“Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del
extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans
neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho-2005.”**

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

PRESENTADO POR:

Bach. JUAN BETO RUIZ ORÈ

AYACUCHO - PERÚ

2007

*A mis padres Juan y
Julia por su
dedicación y esfuerzo
en la cristalización
de mi carrera
profesional.*

*A mis hermanos por
su permanente apoyo
en mi formación
profesional.*

*A mi hija MARA WHINONA
lo mejor de mi trabajo.*

*A Nilda, mi amor
especial por llenar de
alegría mi vida, ser
aliento constante.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjadora de profesionales al servicio de la sociedad.

A mis asesores Q.F. Enrique AGUILAR FELICES y, Q.F. Aldo TINCO JAYO, por su valioso asesoramiento y apoyo en la conducción del presente trabajo de investigación, cuyos esfuerzos se materializan en este informe.

A la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, por ser forjadora de mis conocimientos como futuro profesional Químico Farmacéutico y sus profesores.

A mis padres y hermanos, forjadores de mi persona y profesión.

A las personas que colaboraron en la realización del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE.....	iv
RESUMEN.....	v
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II.MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Antecedentes.....	3
2.2 Aspectos botánicos.....	4
2.3 Toxicidad.....	7
2.4 Cicatrización.....	8
2.4.1 Fases de la cicatrización.....	9
2.4.2 Mecanismos implicados en la cicatrización.....	11
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Ubicación.....	13
3.2 Materiales.....	13
3.2.1 Material vegetal.....	13
3.2.2 Material biológico.....	13
3.3 Metodología.....	14
3.3.1 Métodos de procesamiento del material vegetal.....	14
3.3.2 Determinación de la toxicidad aguda.....	15
3.3.3 Estudio farmacológico.....	16
3.4 Análisis de datos.....	17
IV.RESULTADOS.....	18
V. DISCUSIÓN.....	32
VI.CONCLUSIONES.....	37
VII.RECOMENDACIONES.....	38
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	42

Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho-2005.

AUTOR : Bach. Juan Beto RUIZ ORE

ASESOR: Q.F. Enrique AGUILAR FELICES y Q.F. Aldo TINCO JAYO.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación estuvo orientado a demostrar la toxicidad y efecto cicatrizante de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”, realizado en los laboratorios de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Las hojas fueron colectadas en los meses de febrero a marzo del 2005 en la localidad de Azángaro, provincia de Huanta a 2500 m.s.n.m., luego de su identificación botánica fueron desecadas a temperatura ambiente y se preparó el extracto hidroalcohólico al 80%.

El tamizaje fitoquímico reporta la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, aminoácidos y azúcares reductores.

La toxicidad aguda oral del extracto hidroalcohólico se realizó mediante el método de dosis límite en ratones albinos de ambos sexos, con tres niveles de dosis (50, 200, 2000 mg/kg), los cuales fueron observados durante 14 días sin encontrarse mortalidad. Una vez sacrificados, se evaluó la reducción del peso de los órganos internos presentándose diferencias significativas ($p < 0.05$), concluyéndose que la toxicidad es independiente del sexo.

La actividad cicatrizante se determinó empleando el Test de Howes; a la dosis de 100, 200, 400 mg/kg, el mayor efecto cicatrizante se logró a 400 mg/kg (91.72%), con respecto al estándar (Cicatrin) (100%) encontrándose diferencias significativas.

Palabras clave: *Juglans neotropica* Diels, toxicidad aguda, actividad cicatrizante.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional, es utilizada ampliamente y desde tiempos ancestrales en nuestro país. El conocimiento sobre salud, enfermedad, prevención y tratamiento; ha sido transmitido de una generación a otra; a través del tiempo. Este saber se basa exclusivamente en la experiencia y las observaciones. La planta *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", es de uso frecuente como especie medicinal en casi toda la sierra del Perú, y en algunas zonas de la selva; en este sentido es necesario estudiar científicamente sus efectos con el fin de permitir su uso racional.

Las plantas medicinales constituyen un remedio curativo empleado desde la antigüedad por el hombre. Esta práctica es de gran importancia ya que amplía el arsenal terapéutico y carece de efectos significativos (Jaramillo, 1989).

Juglans neotropica Diels "nogal peruano", es utilizado tradicionalmente para curar afecciones bronquiales, tratamiento de diarrea, cicatrizantes de heridas y llagas, úlceras, diabetes, catarros, inflamaciones y úlceras de la boca. (Vander, 1972)

El presente trabajo de investigación busca contribuir al conocimiento de las bondades de esta especie medicinal para su futuro uso racional, sobre todo ahora que se observa un retorno cada vez mayor, al uso de las plantas medicinales en la terapia, para lo cual se trazo el siguiente objetivos general:

- Evaluar el efecto tóxico y cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Además se planteó los siguientes objetivos específicos:

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico mediante pruebas químicas y cromatográficas.
- Evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".
- Precisar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", que muestre una mayor eficiencia cicatrizante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

En nuestro país no existe un plan estratégico que orienta la investigación y utilización en forma sistemática de los recursos vegetales que tengan como meta su incorporación definitiva al programa de Salud. No existe un inventario de recursos disponibles con este fin, no se dispone con una Farmacopea Nacional de Plantas Medicinales (Cornejo, 1986).

En el Perú desde los primeros momentos del descubrimiento y su conquista se observó que entre los súbditos del vasto imperio, se hallaba muy desarrollado la profesión de curanderos y herbolarios y que estas poseían conocimientos muy singulares sobre las propiedades medicinales y tóxicas de determinadas especies vegetales (Font Quer, 1980).

La bibliografía da cuenta de investigaciones farmacológicas referente al *Juglans neotropica* Diels siendo las siguientes:

Porturas, (1982), Realizó un "Estudio Farmacográfico del *Juglans neotrópica* Diels o "nogal peruano" donde estableció sus usos medicinales para los tratamientos de úlceras, diabetes, cicatrizante, catarros, bronquitis y como astringente.

Carhuallanqui, (2003), determinó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso de *Juglans neotropica* Diels "nogal"; sobre cepas de

Salmonella spp, encontrándose que estas bacterias son sensibles a los componentes activos a la planta; usando como estándar el cloranfenicol a una concentración de 10 mg/ml; y asimismo, determino la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, taninos y fenoles, antraquinonas, triterpenoides y esteroides, azúcares reductores, saponinas, aceites, aminoácidos, lactona y cumarinas.

Chanhualla, (2004) realizó un estudio sobre la “Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” en bacterias Gram positivas causantes de infecciones respiratorias agudas, llegando a la conclusión que fue más eficaz en comparación a las penicilinas.

2.2. ASPECTOS BOTÁNICOS.

2.2.1. CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA.

Se realizó en el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y corresponde al Sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior en 1904 (Anexo 16).

DIVISIÓN	: Antophita (Angiospermae)
CLASE	: Dicotiledoneae
SUBCLASE	: Archyclamideae
ORDEN	: Juglandales
FAMILIA	: Juglandaceae
GENERO	: <i>Juglans</i>
ESPECIE	: <i>Juglans neotropica</i> Diels
NOMBRE VULGAR	: Nogal

2.2.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

El *Juglans neotropica* Diels “nogal”, es una especie arbórea monoica

(Ferreira, 1982). Este árbol nativo de los andes, crece en bosques naturales alcanzando hasta 30 m. con diámetros superiores a 1 metro (Lojan, 1992). Es una planta leñosa de gran porte, de tronco grueso, con grandes y abiertas ramas que forman una ancha copa (Font Quer, 1962).

La inflorescencia tiene la forma de amento, con flores estaminadas, pedunculadas y blanquecinas. El fruto es una drupa indehisciente de cáscara verde, amarga y tintórea, el endocarpio formado por dos valvas iguales y opuestas que cubren una almendra dividida en dos cotiledones (Desmarchelier, 2000).

2.2.3. HABITAT.

Crecen en las huertas y riberas de los ríos de las zonas templadas, en el fondo de los valles en buenos suelos, en hondonadas protegidas contra el viento y donde hay humedad y buen drenaje; rehuye los sitios desabrigados y combatidos por fuertes vientos. En el Perú su distribución se observa entre 1000 y 3000 m.s.n.m. (Lojan, 1992).

2.2.4. USOS Y FORMAS DE APLICACIÓN.

Los usos que se dan a las hojas y frutos del nogal varían en los países: en Ecuador, la infusión de las hojas se utiliza como astringente y antidiarreico, especialmente en los niños. También se utiliza como antiséptico para lavar heridas y úlceras, y asimismo, para lavados vaginales en caso de leucorrea (Gupta, 1995), La infusión de las hojas es empleada para gargarismo como antiinflamatorio de la faringe; de igual modo, la infusión de las hojas se utiliza para bañar una o dos veces a los niños de la cintura para abajo cuando dan los primeros pasos para "endurecer los huesos" y caminen pronto; también se da este baño a las mujeres después del parto (Lojan, 1992). También la corteza del árbol, y las yemas combaten las perturbaciones del hígado, las erupciones de la piel (Bustamante, 2006).

En Colombia la infusión de las hojas y frutos sirve para teñir las canas y prevenir la caída del cabello. La infusión de las hojas se toma como depurativo de la sangre. La infusión de las raíces se toma para tratar afecciones del hígado. (Cornejo, 1986) Con la infusión de las hojas se prepara un jarabe que se endulza para tomarlo en cucharadas para la tos. Se indica que este jarabe es bueno para el tratamiento de la escrófula en estado primario (Cordova, 2001) (Basto, 2001).

Se hace hervir una hoja de nogal en un litro de leche para tomarla diariamente, dicen que los campesinos que así el sabor se parece al vino y alimenta al cerebro. Otros toman el “agua de nogal” como mate o té o agua aromática haciendo hervir una hoja en un litro de agua (Lojan, 1992).

La flora peruana tiene al *Juglans neotropica* Diels o “nogal” nativo del valle del Marañón, se cultiva como árbol ornamental. Sus hojas se usan en medicina popular para combatir las afecciones bronquiales (Ferreira, 1982).

Cornejo, (1981) señala que una de las grandes principales virtudes de esta planta radica en sus grandes propiedades tintóreas. Las hojas, frutos inmaduras, ramas tiernas y corteza del tallo; proporcionan variadas tonalidades de colores suaves de marrón – caoba; dependiendo de estos matices del tipo de muestra, la cantidad de la misma, el tipo de mordiente y el tiempo de ebullición. Hasta la fecha no se ha encontrado una especie similar en sus propiedades tintóreas que pueda suplir satisfactoriamente esta planta; por lo que urge su propagación masiva y una explotación racional y planificada no como se viene explotando actualmente de manera indiscriminada.

Como medicina se usa el pericarpio verde de los frutos y las hojas tiernas y yemas, las que se cortan en trozos pequeños y secos. La terapéutica moderna, las emplea como astringente en los tratamientos gástricos e intestinales, tónico y depurativo, calmante del sistema nervioso y hemostático. En aplicaciones

externas las preparaciones a base de nogal sirve en dermatología para curar las hinchazones o úlceras de la piel con ardor o picazón. Para neutralizar el flujo blanco se hacen irrigaciones vaginales (Romero & De la Cruz, 1997).

2.3. TOXICIDAD.

Efectos nocivos o adversos que una sustancia puede producir: puede ser aguda, sub aguda y crónica (Cotillo, 1998).

2.3.1. TOXICIDAD AGUDA.

Son los efectos adversos o mortales que produce una sustancia en un lapso de 24 horas cuando se administra en dosis elevadas. La toxicidad aguda tiene por objeto determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal y la toxicidad aguda se expresa por la dosis letal 50, que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados. En general, el test se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar.

La determinación de la DL_{50} se suele llevar a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles (i.v., i.m. ip. s.c. y oral). En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce unos severos efectos adversos.

2.3.2. TOXICIDAD SUB AGUDA.

Es la toxicidad que se produce con dosis de fármaco que individualmente no produce efectos tóxicos y puede presentarse cuando el uso de la misma

se hace por el lapso de uno a dos meses (Cotillo, 1998).

En este test, la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Las principales administraciones sanitarias requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad sub aguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia (vehículo, dosis baja, media - dosis alta o vehículo - dosis baja -dosis media baja - dosis media alta - dosis alta).

En la rata se requieren al menos 10 animales de cada sexo para cada dosis y en el perro, al menos 4 animales de cada sexo. Muy frecuentemente, se añaden dos grupos satélite de animales (uno tratado con vehículo y otro con la dosis más alta) que no son sacrificados al final del estudio, sino que se les deja una o dos semanas para recuperarse las posibles lesiones inducidas por el producto.

Durante el estudio se controlan diariamente un buen número de parámetros (aspecto, comportamiento, peso, consumo de agua y alimento, examen oftalmoscópico, etc.) y al final los animales son sacrificados y autopsiados. Al inicio del estudio y antes de la autopsia, se toman muestras de sangre y orina para ser analizadas. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen anatomopatológico.

2.3.3. TOXICIDAD CRÓNICA.

Son las alteraciones funcionales que se presenta cuando se administra un fármaco por un periodo prolongado (Cotillo, 1998).

2.4. CICATRIZACIÓN,

Una cicatriz es una masa de colágeno que se produce cuando no es

posible reparar la necrosis de células parenquimatosas por regeneración. Si se destruyen las células hasta la capa basal, de la dermis o epidermis sucede una reparación con formación de cicatriz (Parakrama, 1998).

2.4.1 FASES DE LA CICATRIZACIÓN.

1. REGENERACIÓN.

Es la reconstrucción de la arquitectura original de cualquier órgano o tejido, en respuesta al daño ocasionado por el desgaste normal, o como consecuencia de abrasiones o quemaduras superficiales, no importando su extensión.

2.- REPARACIÓN.

Es la reconstrucción de los tejidos lesionados sin reestructuración de la arquitectura original, y por lo tanto dejando grados variables de distorsión, usualmente permanente y/o desorganización arquitectónica con consecuencias inevitables (Falabella, 1994).

Después de 24 horas de la lesión comienzan a proliferar los fibroblastos y las células endoteliales, formando (a los tres días), un tejido especializado (tejido granulado). El termino "tejido de granulación" se debe a su aspecto granular blando en la superficie de las heridas, aunque lo más característico es el aspecto histológico (proliferación de pequeños vasos neoformados y fibroblastos), los nuevos vasos se forman por un proceso denominado angiogénesis o neovascularización en los vasos preexistentes (Cotran, 1998).

3. CICATRIZACIÓN DE HERIDAS.

La cicatrización como proceso restaurador puede producirse en forma normal o patológica, cuando es normal puede ser de dos tipos:

a.- Cicatrización por primera intención.

Es aquella que se produce en una herida aséptica y sin pérdida de sustancia (tejido) y cuyos bordes vuelven a ponerse en contacto. Este tipo de

cicatrización, es la que ocurre en la mayoría de las incisiones quirúrgicas (Hernández, 1991).

El proceso de cicatrización por primera intención es la siguiente:

- A las 24 horas: aparecen los neutrófilos en el margen de la incisión desplazándose hacia el coagulo de fibrina. Los bordes de la epidermis aumentan de grosor por la actividad mitótica de las células basales.
- A las 48 horas: brotes de células epiteliales migran y crecen a lo largo de la superficie de corte de la dermis, depositando material de membrana basal a medida que se desplazan. Se lesionan en la línea media, por debajo de la costra, produciéndose una capa epitelial continua pero fina.
- A los 3 días: los neutrófilos han sido sustituidos en gran parte por macrófagos, el tejido de granulación invade progresivamente el espacio de la incisión. Las fibras de colágeno están ahora presentes en los márgenes en un principio orientados verticalmente por lo que no se unen los bordes de la incisión. La proliferación epitelial continua y sigue aumentando de grosor la capa de epidermis.
- A los 5 días: el espacio de la incisión esta ocupado por tejido de granulación. La neovascularización es máxima, las fibras de colágeno son más abundantes y comienzan a sellar la incisión. La epidermis recupera su espesor normal y la diferenciación de las células de la superficie da lugar a una arquitectura epidérmica madura y queratinizada.
- Durante la segunda semana se produce una continua acumulación de colágeno y proliferación fibroblástica. El infiltrado leucocitario, el edema y el aumento de la permeabilidad vascular han desaparecido en gran parte. En este momento comienza el largo proceso de blanqueamiento (o palidez) que se debe al aumento de fibras colágenas en la cicatriz.
- Al final del primer mes la cicatriz esta formada por tejido conjuntivo

desprovisto de células inflamatorias, cubiertas ahora por un cicatriz intacta (Cotran, 1998).

b.- Cicatrización por segunda intención o granulación.

Es aquella que se producen en heridas sépticas, con pérdidas de sustancia y cuyos bordes no se ponen en contacto; es cuando la pérdida de células y tejidos es más extensa, como ocurre en el infarto, en la ulceración inflamatoria, en los abscesos y en las heridas superficiales con grandes defectos, el proceso de reparación es más complicado. Hay presencia de un gran defecto tisular que tiene que ser rellenado.

La regeneración de las células parenquimatosas no restablece completamente la arquitectura original. Para completar la reparación crece abundante tejido de granulación desde los márgenes.

En la actualidad la diferencia entre estas dos, es solamente de grado, ya que en la secuencia del proceso ambos son esencialmente iguales. Este procedimiento se da en tres fases que interaccionan: (Hernandez, 1991).

- Fase de actividad celular.
- Fase de actividad vascular.
- Fase de depósito de sustancias y fibras intracelulares.

(Cotran, 1998).

2.4.2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA CICATRIZACIÓN.

La curación de las heridas es un proceso complejo, en el que participan diversos procesos como inducción de un proceso inflamatorio agudo por la propia herida, la regeneración, migración y proliferación de las células parenquimatosas y del tejido conjuntivo, la síntesis de proteínas de la membrana extracelular, el remodelaje del tejido conjuntivo y de los componentes parenquimatosos, así como la colagenización y reforzamiento de la cicatriz. Los mecanismos subyacentes a estos fenómenos son: los mediadores de la

inflamación aguda, el papel que desempeña los factores de crecimiento y las interacciones célula – membrana extracelular en la emigración, proliferación y diferenciación celular, así como los mecanismos de angiogénesis y fibrosis de la inflamación crónica.

El depósito de matriz del tejido conjuntivo (colágeno), su remodelaje es una cicatriz y el reforzamiento de la misma son los efectos finales del proceso organizado de reparación de heridas (Cotran, 1998).

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. UBICACIÓN.

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicada en la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una altitud de 2750 m.s.n.m., durante los meses de marzo a junio del año 2005.

3.2. MATERIALES.

3.2.1. MATERIAL VEGETAL.

- 500 gramos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano" en un estado de madurez, con presencia de inflorescencias y frutos, obtenida en la Localidad de Azángaro, provincia de Huanta, situada aproximadamente a los 2500 m.s.n.m.

3.2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

- 70 ratones albinos consanguíneos, de ambos sexos, adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (INS), dependencia del Ministerio de Salud (MINSa), en la ciudad de Lima; con una edad aproximada de 9 semanas y una masa corporal de 20 ± 2 g, los cuales fueron adaptados a las condiciones de bioterio y alimentados a base de cebada, maíz y agua *ad libitum*.

3.3. METODOLOGÍA.

3.3.1. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.

a.- Muestra desecada.

La muestra recolectada se secó en una superficie plana bajo sombra y buena ventilación por un mes a temperatura ambiente bien extendida para evitar su descomposición. Al mismo tiempo se cambio el papel de soporte cada 24 horas.

b.- Secado y Molienda.

La muestra se trituró empleando un mortero, con la finalidad de reducirla hasta un polvo fino, luego con un tamiz de 0.125 de diámetro se separó restos celulares.

c.- Preparación del extracto hidroalcohólico al 80%.

Se realizó de acuerdo al método descrito en el Manual de Técnicas de Investigación CYTED (1995). Se maceró 500 g. de hojas con una mezcla de 1200 mL de etanol de 96° y 300 mL de agua destilada por un periodo de 07 días, facilitando la extracción mediante agitaciones esporádicas y protegiéndolo de la acción de la luz; transcurrido este tiempo se realizó el filtrado y el residuo obtenido fue sometido a dos extracciones más. El filtrado se realizó al vacío con la ayuda de un embudo de Büchner y papel de filtro Whatman N° 01.

d.- Tamizaje Fitoquímico del Extracto hidroalcohólico.

d.1. Pruebas Químicas.

Se siguió la metodología recomendada por (Miranda y Cuellar 2000). (Anexo N° 14).

d.2. Pruebas Cromatográficas

Este procedimiento se efectuó teniendo en cuenta la técnica referida por (Wagner, H. y Bladt, S. 1996).

➤ Muestra : extracto hidroalcohólico al 80% de hojas de "nogal "

- Soporte : silicagel G tipo 60 en base de vidrio, 5 x 20 cm.
- Fase móvil : acetato de etilo, ácido gálico, ácido acético glacial, agua
(100:11:11:26)
- Revelador : Cloruro férrico.

3.3.2 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.

3.3.2.1 MÉTODO DE DOSIS LÍMITE.

Se siguió la técnica descrita por Rodríguez (2004). Se formó 4 grupos de ratones mediante selección aleatoria (tres experimentales y un control) conformado por 6 animales cada uno, 3 de cada sexo. El extracto hidroalcohólico al 80% se resuspendió en carboximetilcelulosa al 1%, administrándose dosis únicas de 2000, 200 y 50 mg/kg (cada dosis en cada grupo), vía oral, retirándose la comida 6 horas antes del ensayo; el grupo control sólo recibió el vehículo. La administración se realizó mediante sonda orogástrica (Anexo 18).

Los animales fueron observados durante 14 días, al finalizar este periodo se procedió al sacrificio para realizarles la autopsia, y se efectuó un examen macroscópico de órganos principalmente: corazón, riñón, bazo, pulmón e hígado. El peso corporal se controló al inicio y al final del experimento (Wallace, H. 1989), (MSP, 1993).

3.3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA.

Tratamientos				
Grupos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Conc.	2000mg/Kg.	200mg/Kg.	50 mg/kg.	Blanco
Machos	R3	R3	R3	R3
Hembras	R3	R3	R3	R3

Nota:

Los grupos I, II y III corresponden a los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", y el grupo IV corresponde al blanco.

3.3.3. ESTUDIO FARMACOLÓGICO.

3.3.3.1 TEST DE CICATRIZACIÓN POR EL METODO DE HOWES E.

Se depiló el lomo a los ratones en un área aproximada de 2 cm², 24 hrs. antes del Test, con el fin de descartar una reacción alérgica a la crema depiladora.

1. Se pesó los ratones y se les colocó en jaulas individuales.
2. Se anestesió al animal con Fenobarbital Sódico (75mg/Kg.), por Vía Intraperitoneal.
3. Luego de desinfectar el área depilada se realizó una incisión de 1 cm. de largo en el tercio del lomo y perpendicular al eje longitudinal del ratón.
4. Se afrontó los bordes de la herida con un punto de sutura de nudo triple.
5. Se administró en forma tópica la 1ra. dosis del tratamiento (El extracto hidroalcohólico al 80% se resuspendió en carboximetilcelulosa al 1%).
se repite cada 12 horas hasta el término del periodo de aplicación.
6. Pasadas las 96 hrs. se procedió a sacrificar al ratón con una sobredosis de Fenobarbital Sódico.
7. Posteriormente al sacrificio, se quitó el punto de sutura y se colocó al animal en posición de cubito ventral sobre el aparato de tensión.
8. Se insertó las agujas del aparato de Tensión a 0.50 cm. de los bordes de la herida y se empleó una bureta (previamente enrasada con agua destilada) para dejar caer el líquido al vaso hasta que se genera una tensión que abre la herida en toda su longitud.
9. Se anotó el nivel alcanzado.
10. Luego se determinó el porcentaje de la actividad cicatrizante.

(Howes E, 1929).

Es la expresión de la resistencia que muestra la cicatriz al ser sometido a una tensión, y que se expresa en porcentaje de la siguiente manera:

$$\% \text{ Act} = \frac{X_{to} - X_c}{X_c} \times 100$$

Donde:

X_{to} = Volumen de agua que rompe la tensión de la herida del grupo tratado.

X_c = Volumen de agua que rompe la tensión de la herida del grupo blanco.

3.3.3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA ACTIVIDAD CICATRIZANTE.

Tratamientos					
Grupos	GRUPO I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
Concen.	50mg/Kg.	200mg/Kg.	2000mg/Kg.	Control Cicatrin	Blanco
Lote1	R4	R4	R4	R4	R4
Lote2	R4	R4	R4	R4	R4

NOTA:

Los grupos I, II y III corresponden a los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Cada Grupo consta de 8 ratones albinos y 4 por lote.

El grupo IV fue tratado con Cicatrin como control.

Grupo V se considera como blanco.

3.4 ANÁLISIS DE DATOS.

Los resultados son presentados en forma de tablas, gráficos de barra de error, histograma y serán contrastados con la prueba estadística del análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey al 95 % de confianza.

IV. RESULTADOS

CUADRO 01: Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho – 2005.

Metabolitos	Reacciones de identificación	Resultados	Características
Alcaloides	Oragendorff	+++	Precipitado naranja
	Mayer	+++	Precipitado blanco
	Hager	++	Precipitado blanco
	Wagner	++	Color marrón
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Azul oscuro
Flavonoides	Shinoda	++	Color roja
Azúcares reductores	Fehling	+	Precipitado rojo
Saponinas	Espuma	+	Presencia de espumas
aminoácidos	Ninhidrina	+	Color violeta
aceites	Sudan III	-	Color verde
Antraquinonas	Borntrager	-	Color amarillo

Leyenda:

Reacción : RX Leve : (+)
 Positivo : (+) Moderado : (++)
 Negativo : (-) Abundante : (+++)

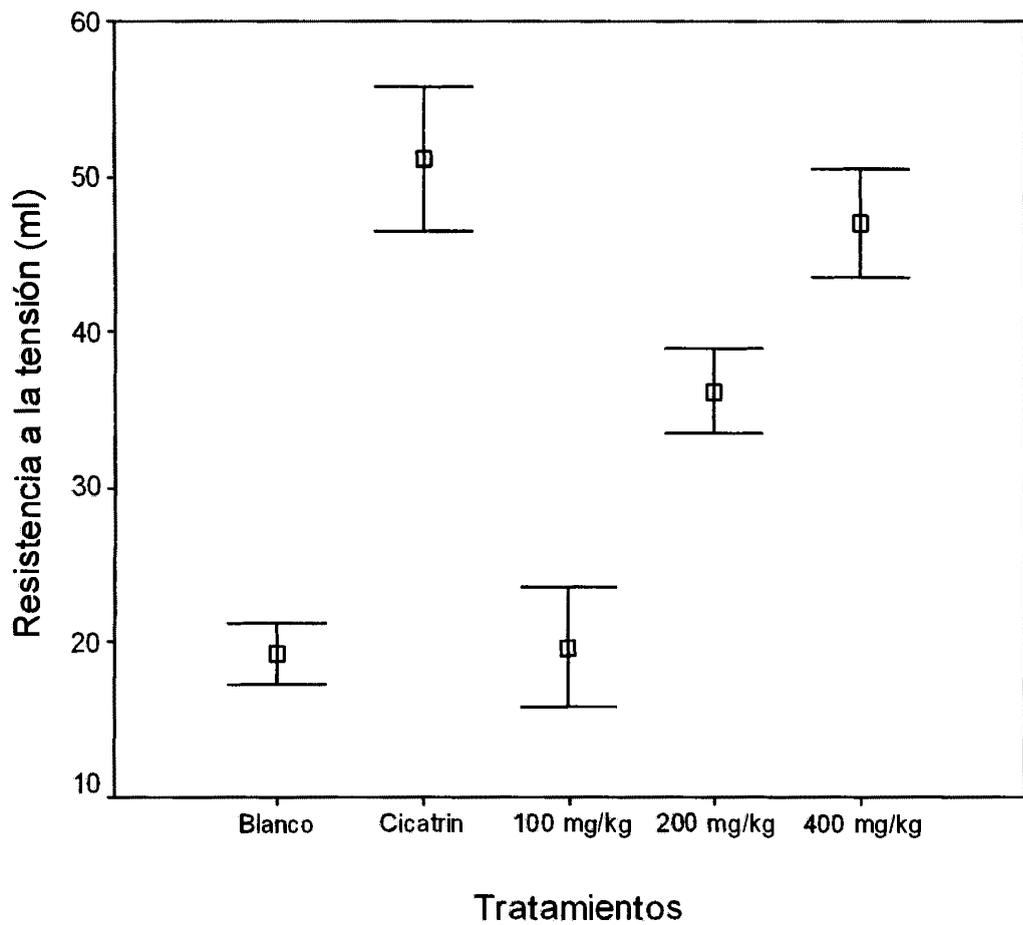


GRÁFICO Nº 1. Variación de la resistencia a la tensión por efecto de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho – 2005.

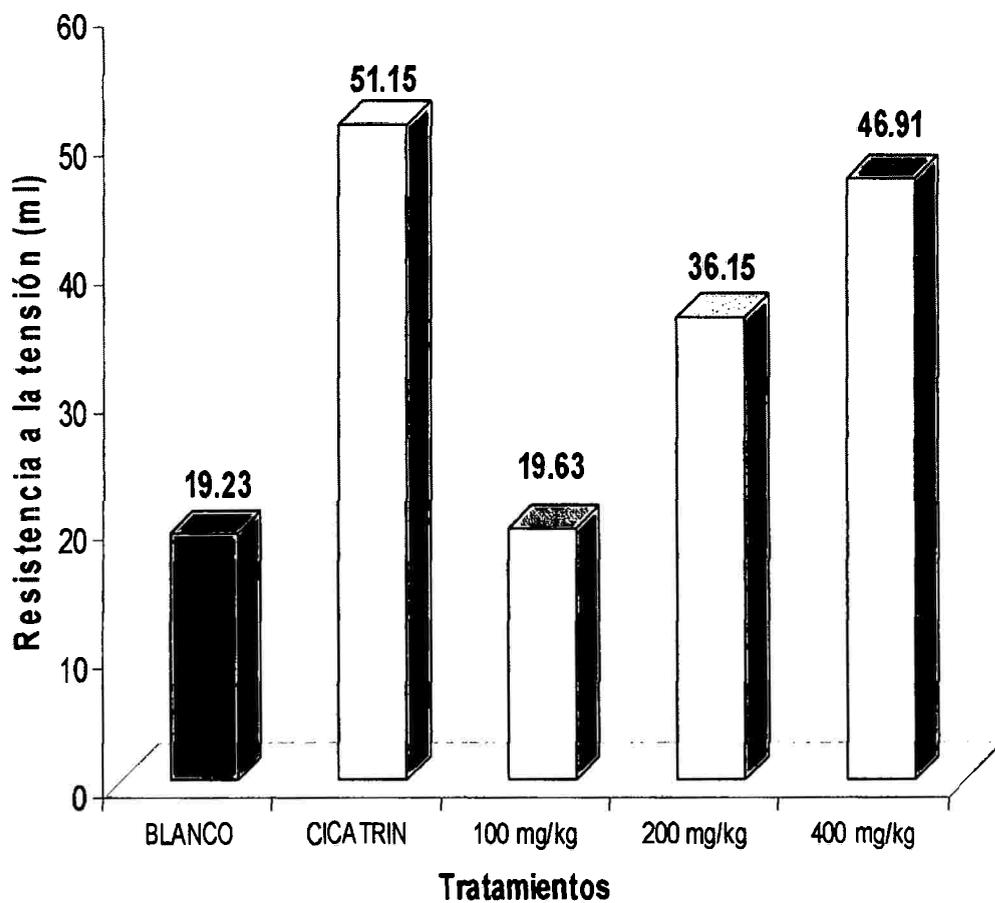


GRÁFICO N° 2. Promedio de resistencia a la tensión por efecto de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho– 2005.

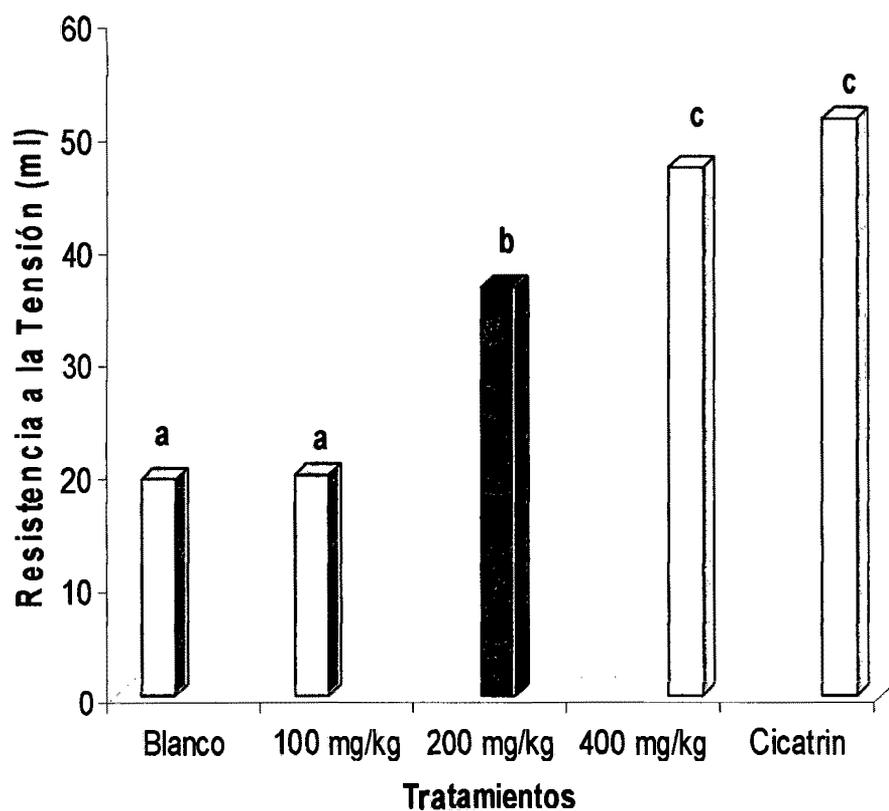


GRÁFICO Nº 3. Representación de la Prueba de Tukey de la resistencia a la tensión por efecto de la actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho – 2005.

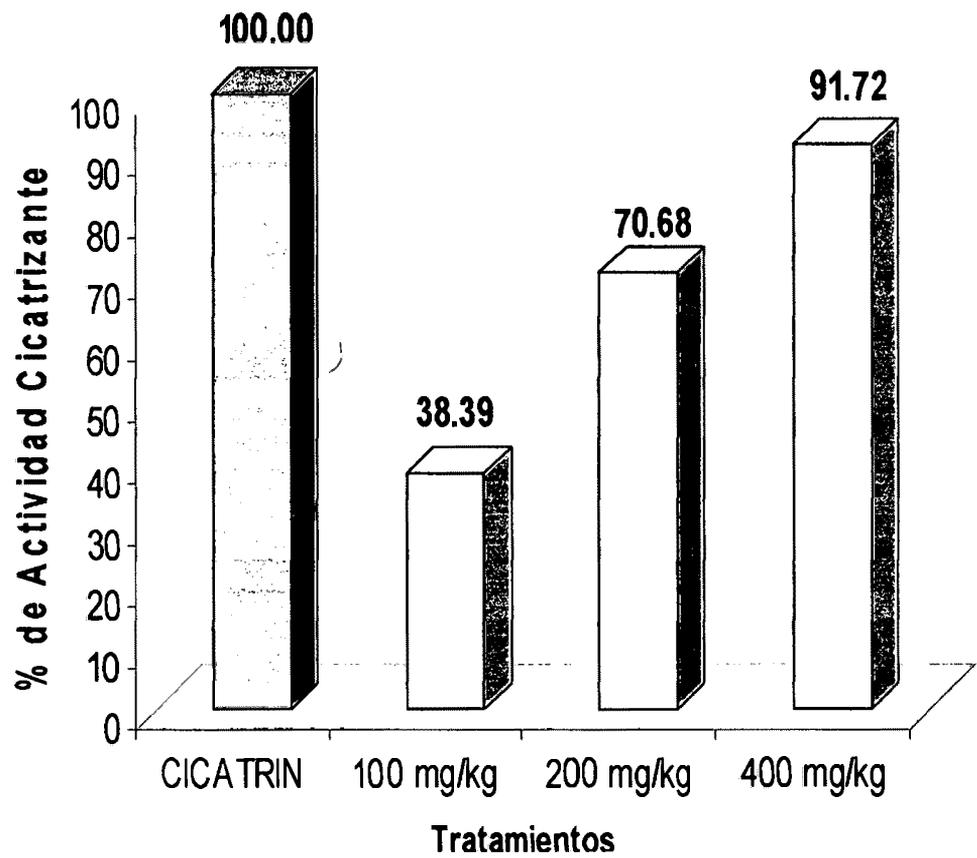


GRÁFICO Nº 4. Porcentaje de actividad del efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

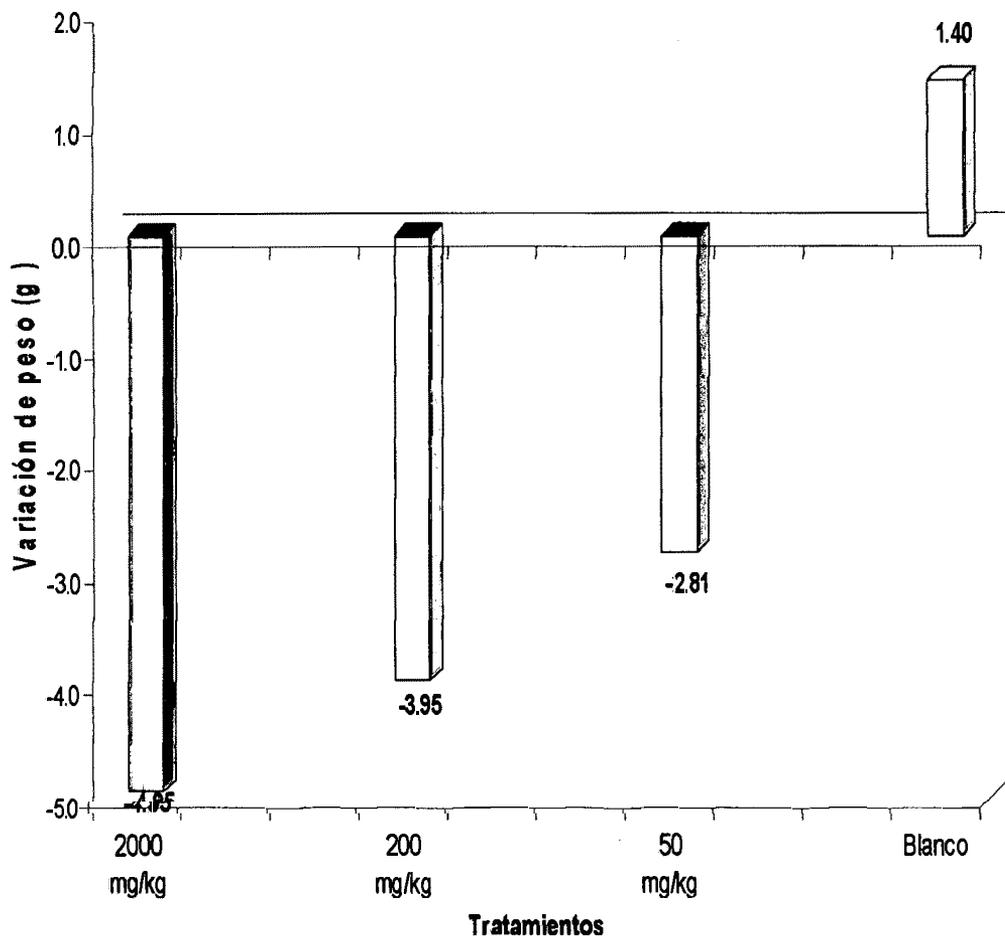


GRÁFICO Nº 5. Variación de peso por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

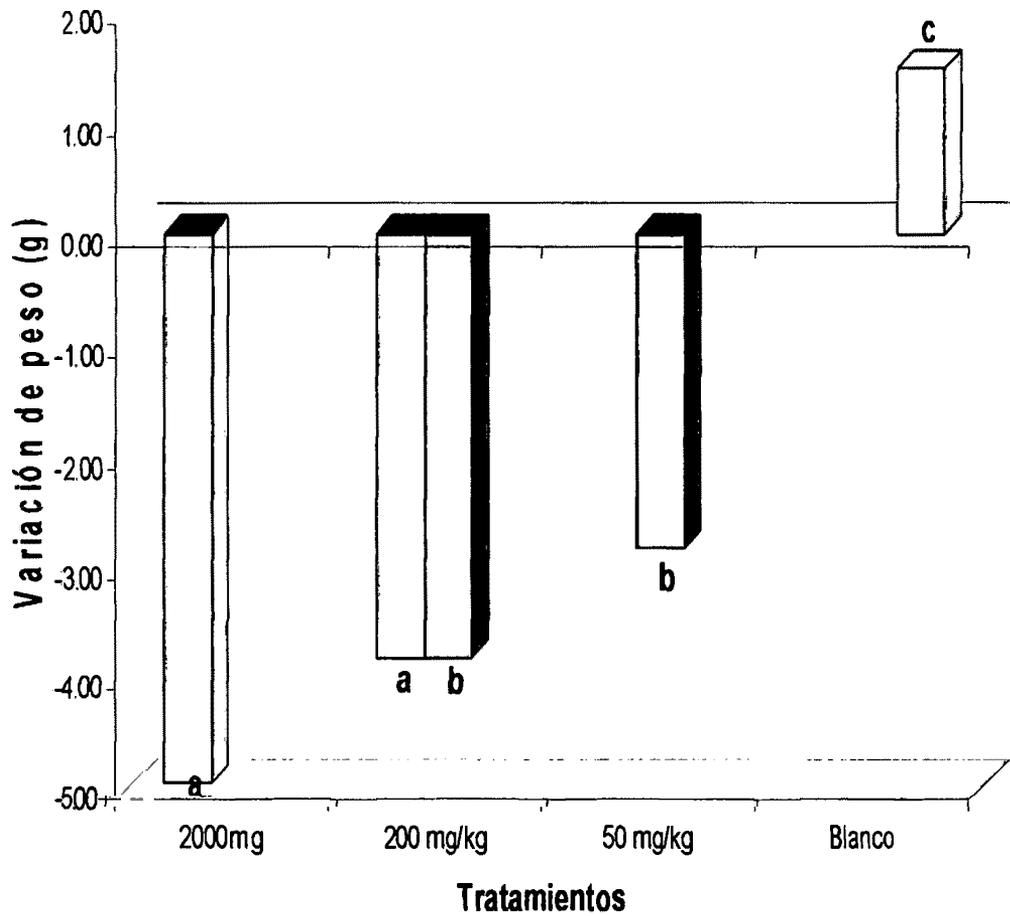


GRÁFICO Nº 6. Representación de la Prueba de Tukey de la variación de peso por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho – 2005.

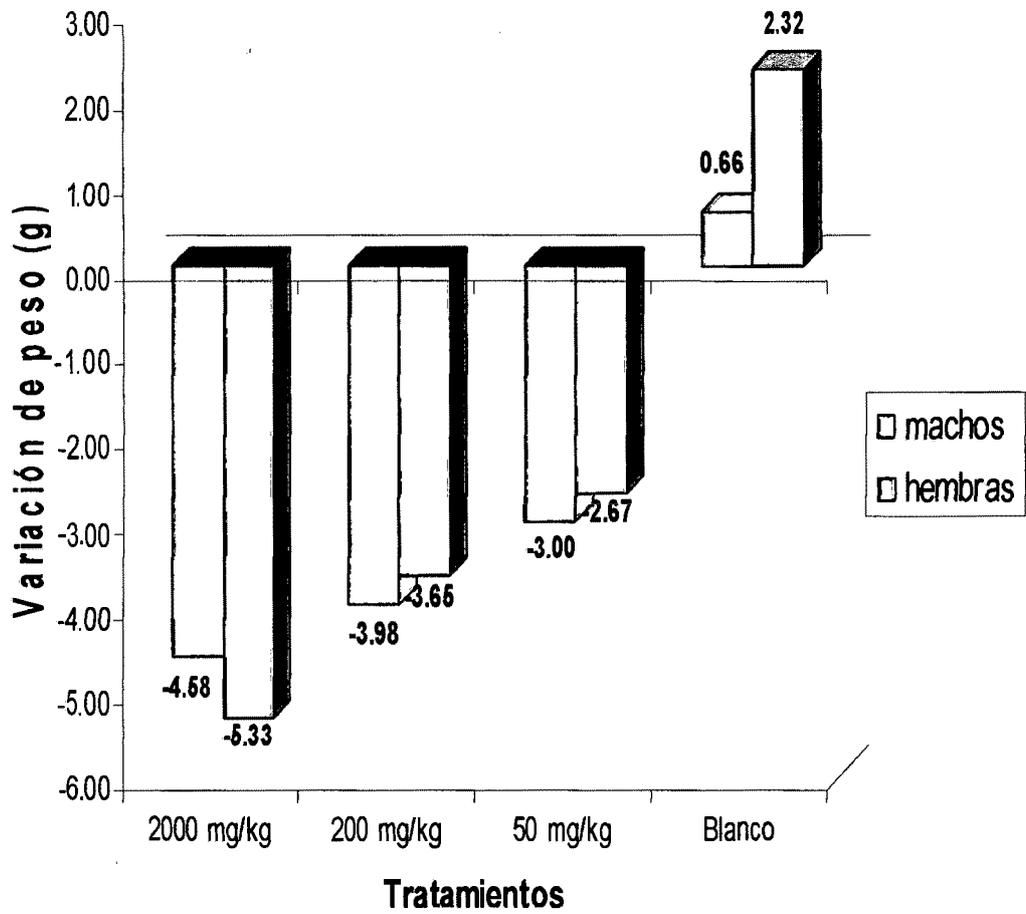


GRÁFICO Nº 7. Variación de peso según el sexo por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho-2005.

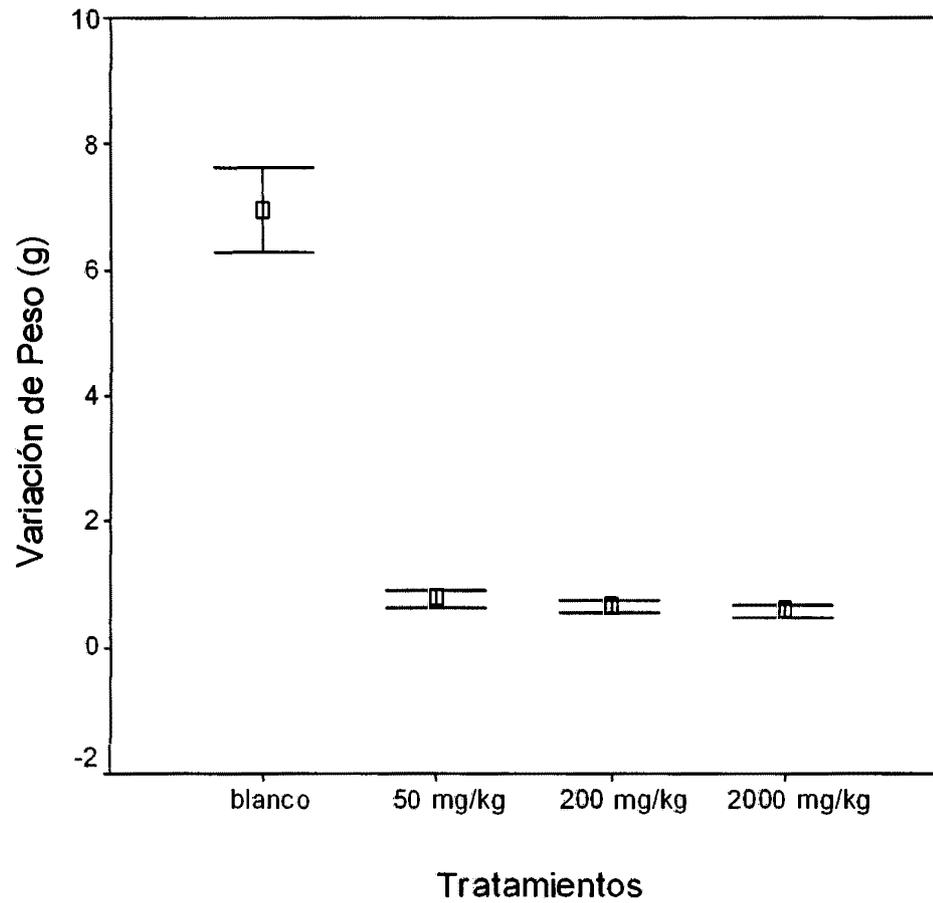


GRÁFICO N° 8. Variación de peso del hígado de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho–2005.

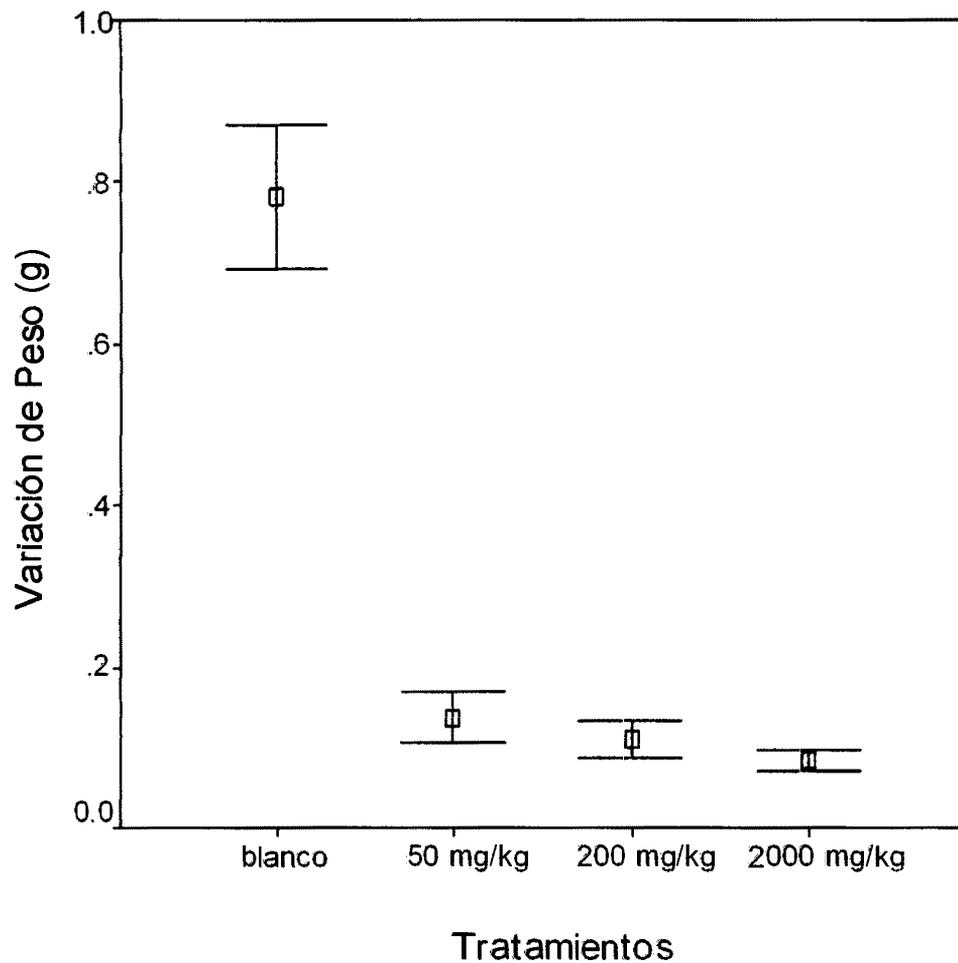


GRÁFICO Nº 9. Variación de peso del corazón de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho—2005.

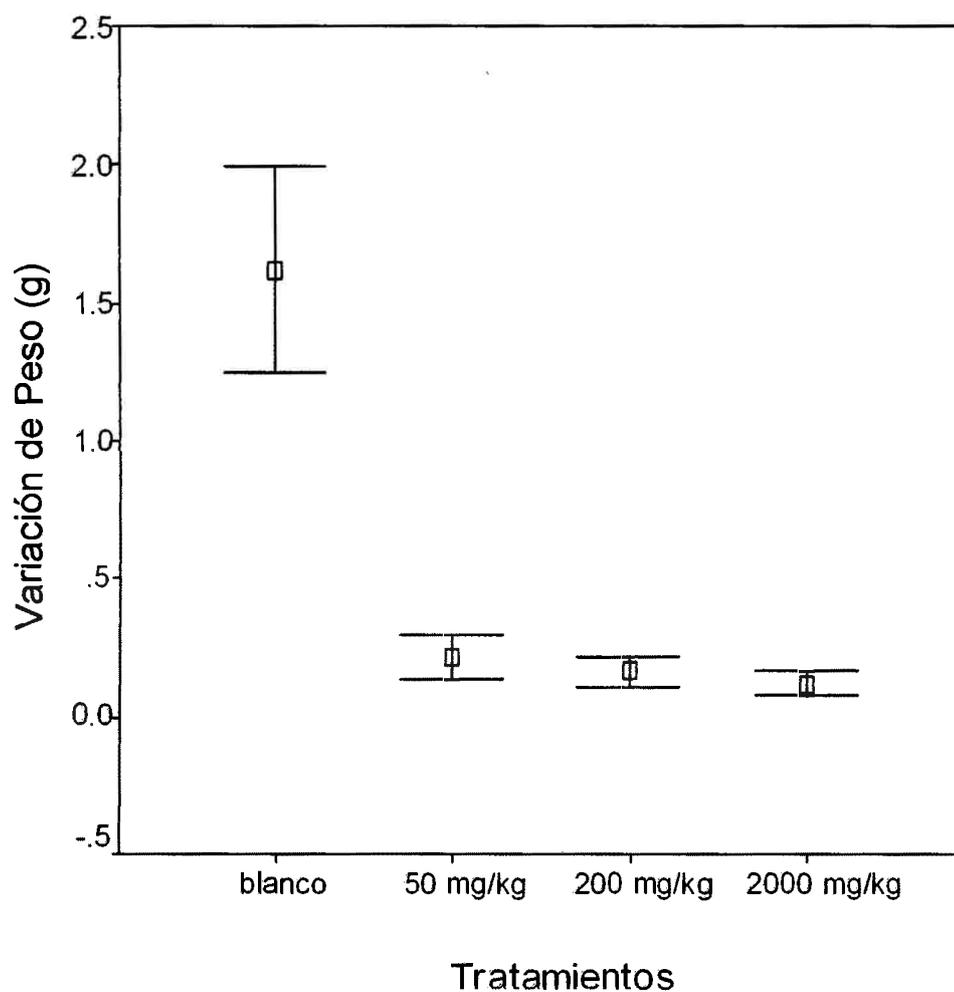


GRÁFICO Nº 10. Variación de peso de los pulmones de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho – 2005.

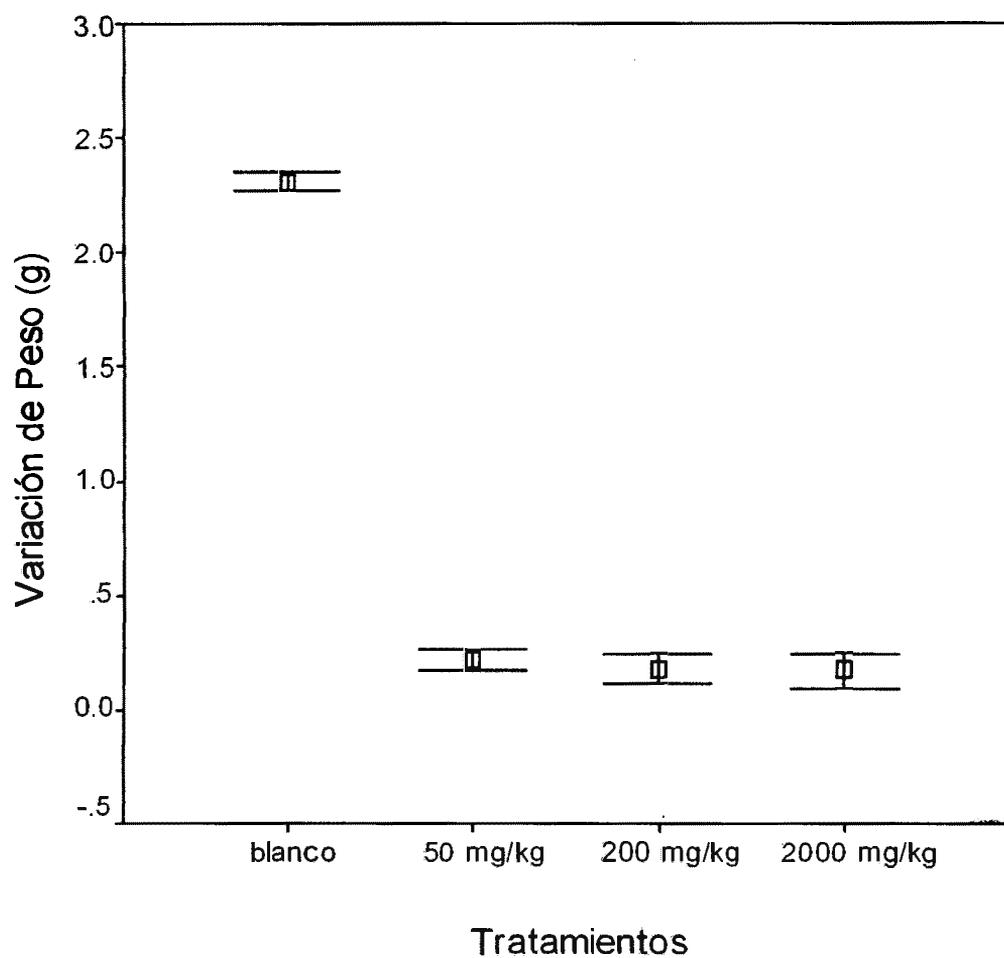


GRÁFICO Nº 11. Variación de peso de los riñones de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho – 2005.

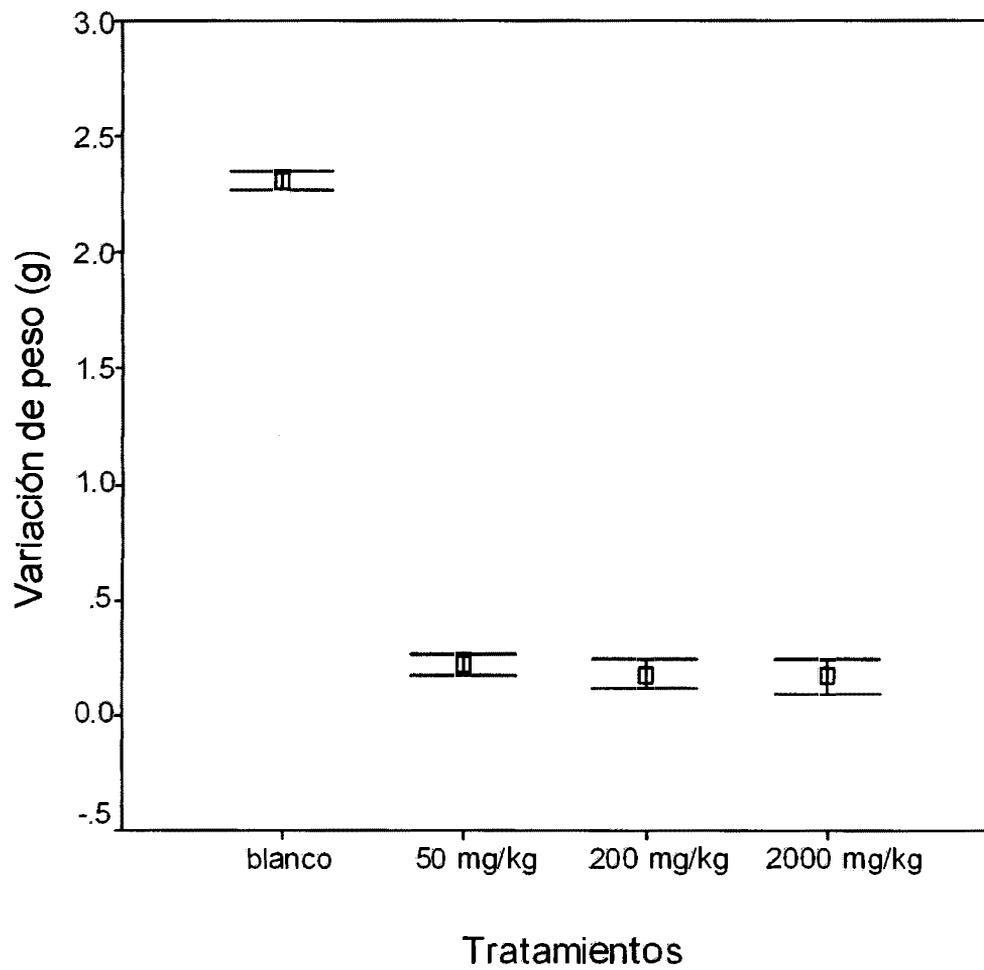


GRÁFICO N° 12. Variación de peso del bazo de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano”. Ayacucho – 2005.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo constituye un aporte al estudio y mejor conocimiento de una planta de nuestra región como es la *Juglans neotropica* Diels, más conocido en nuestra zona como “nogal”.

En la Cuadro N° 01 se observa que el extracto hidroalcohólico de nogal tiene los siguientes metabolitos secundarios: taninos, flavonoides y alcaloides, en menos porcentaje encontramos aminoácidos, saponinas y azúcares reductores, Carhuallanqui (2003), además se encontró en el trabajo realizado otros metabolitos secundarios como antraquinonas, triterpenos y esteroides, lactonas y cumarinas.

A cada uno de los metabolitos secundarios se destaca una función específica. (Harrisón, 1983), menciona que los taninos tiene la propiedad de precipitar las proteínas formando tanatos de proteínas insolubles, originando un efecto antimicrobiano, antifúngico y antiséptico; de igual manera (Cordova, 2001), define que la acción de los taninos se combinan con las proteínas de la piel y de la mucosa compuestos insolubles. Eliminan por lo tanto la base del cultivo a las bacterias que intentan colonizar la piel y las mucosas, evitando así la putrefacción, además interaccionan con los alcaloides que en presencia de los taninos precipitan, de igual manera (Muñoz, 1994), reitera que los taninos tienen la propiedad de fijarse a las proteínas formando complejos. Su propiedad de

astringencia se emplea en el uso externo como cicatrizante y el tratamiento de heridas, esta propiedad esta ligada, a su capacidad para unirse a las proteínas de la piel y de las mucosas, provocando una especie de curtido, haciendo que las capas superficiales sean menos permeables y protejan a las capas subyacentes.

Con la cromatografía en capa fina (Anexo N° 19) se evidenció la presencia de taninos por la coloración azul oscuro de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Posiblemente sean del tipo de tanino gálico por la coloración azul característica (Bruneton, 1991).

Adicionalmente de modo general podemos decir que se trata de compuestos fenólicos como los flavonoides.

Los flavonoides protegen el daño tisular neutralizando los radicales libres producidos por el neutrófilo en el sitio de la inflamación (Bruneton, 1991).

En el Gráfico N° 01 se observa que a mayor dosis del extracto hidroalcohólico aumenta la resistencia a la tensión, por lo que asumimos que los tejidos se van regenerando, siguiendo el proceso de cicatrización. Este proceso es dosis dependiente, a mayor dosis, mayor resistencia. Se observa que a 400 mg/kg se obtiene una resistencia semejante al control (cicatrin); los resultados son confiables por que existe poca variabilidad en cada uno de los ensayos.

En el Gráfico N° 02 observamos que el promedio de la resistencia a la tensión también es dosis dependiente y que a dosis de 400 mg/kg tiene una actividad semejante al control.

En el Gráfico N° 03 se muestra la representación de la Prueba de Tukey, en donde podemos observar tres grupos con efectos cicatrizantes diferentes: a) el blanco y la dosis de 100 mg/kg, tienen el mismo comportamiento cicatrizante; b) 200 mg/kg que es diferente a los otros tratamientos y c) 400 mg/kg con el control (cicatrin) tienen el mismo comportamiento cicatrizante, en los tres grupos

existe diferencia significativa estadísticamente entre las concentraciones tratadas y el efecto cicatrizante, ya que se encontró una significancia mayor de 0.05 ($p < 0.05$).

En el Gráfico N° 04 se observa el porcentaje de actividad cicatrizante, en donde el control (Cicatrín) se considera con un 100 % de actividad y la dosis de 400 mg/kg tiene un 91.72 % de actividad por tanto, podemos inferir que tienen un porcentaje de actividad semejante. Asimismo, el control tiene una formulación con antibióticos (Sulfato de neomicina, bacitracina, glicina) quienes actúan sinérgicamente en el proceso de cicatrización.

El extracto hidroalcohólico está constituido por varios metabolitos secundarios arriba descritos (Cuadro N° 01). La literatura refiere que los taninos son astringentes y precipitan proteínas; es decir permiten la regeneración de la piel; además concomitantemente tienen actividad bactericida y bacteriostática sobre una serie de microorganismos, demostrado por Carhuallanqui (2003) y Chanhualla (2004); por ende impiden el desarrollo de procesos infecciosos.

Los flavonoides, son conocidos por tener actividad antioxidante por ser polifenoles que atrapan radicales libres; por tanto, impiden procesos necróticos y la potenciación de los procesos inflamatorios; además también tienen actividad antibacteriana (Bruneton, 1991).

Se podría afirmar que en los procesos de cicatrización intervienen simultáneamente los agentes que producen astringencia, precipitan proteínas, neutralizan los radicales libres, inhiben mediadores de la inflamación e impiden el crecimiento microbiano como son los taninos y flavonoides.

En el Perú se realizaron estudios para evaluar el efecto cicatrizante de plantas medicinales utilizando el método tensiométrico (Planas MC, 1984) (Villegas LF, 1997), y corroborando el método tensiométrico con estudios histológicos (Arroyo J, 1999).

En el Gráfico N° 05 asumimos en cuanto a la masa corporal se observó una disminución escalonada a mayor dosis mayor disminución de peso; el de 50mg/kg (-2.81 g); de 200mg/kg (-3.95 g); 2000mg/kg (-4.95 g); en cambio en grupo control hubo un aumento (1.40 g). Al realizar el Anova (Cuadro N° 3) se encontró una significancia menor a 0.05, que indica que hubo diferencias estadísticamente significativas en la variación de peso teniendo en cuenta los tratamientos administrados.

Uno de los indicadores de toxicidad es el control del peso al inicio y al final del ensayo, al no existir ganancia de peso similar al control, significa que existe algún grado de toxicidad, que podría deberse a un proceso de estreñimiento crónico producto del efecto astringente de los taninos presentes en el extracto, pero no hay muerte durante los 14 días.

En el Gráfico N° 6 se observa la prueba de Tukey para la variación de peso en donde podemos observar que los tres tratamientos presentan diferentes comportamientos, situación que hace deducir que el efecto del extracto es dependiente de la dosis a) 2000mg/kg con 200mg/kg; b) 200mg/kg con 50mg/kg y C) blanco según la (Cuadro N° 11), se encontró una significancia ($p < 0.05$), en los tres grupos que indica que existe diferencias estadísticamente significativas en la variación de peso según la dosis.

En el Gráfico N° 7 se observa la variación de peso según el sexo por efecto de los tres dosis ensayadas, en donde no existe diferencias en cuanto al sexo, es decir, que ambos machos y hembras sufren los mismos efectos y pierden peso por efecto de los tratamientos; esto es corroborado por el análisis de varianza múltiple (Cuadro N° 04); en donde existe significancia estadística en dosis; pero no en cuanto al sexo. Podemos afirmar que los efectos secundarios, son independientes del sexo.

En los Gráficos N° 8, 9, 10, 11, 12 se evidencia las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), en cada órgano (corazón, hígado, bazo, pulmones, riñones), las barras de error de la dosis no están al mismo nivel que la barra del control; los resultados de la Prueba de Tukey mostrados en los Cuadros N° 12, 13, 14, 15, 16, avalan las diferencias estadísticas encontradas, en los que además la toxicidad es dependiente de la dosis, donde encontramos que existe diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos con el grupo control ($p < 0.05$).

Durante el análisis macroscópico de los órganos internos no se encontró modificaciones en cuanto al color, textura y forma; aparentemente el peso fue el único parámetro afectado, se debe considerar un análisis microscópico que podría revelar modificaciones estructurales en la histología de los órganos.

Las pruebas de toxicidad son muy importantes para determinar los efectos perjudiciales de cualquier sustancia introducida en el organismo. Son indispensables para considerar que un tratamiento es seguro. Existe diferentes ensayos para determinar la toxicidad aguda oral (Cáceres, 1996), de la cual se escogió el método de dosis límite que sirve para determinar la Dosis Letal 50 (DL_{50}).

No se pudo determinar el valor de la DL_{50} debido a que no hubo mortalidad de los animales.

Finalmente podemos afirmar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels no producen una toxicidad aguda, pero aparentemente tienen algún efecto secundario que no se ha podido determinar en el presente trabajo, que afecta el desarrollo normal del animal de laboratorio.

VI. CONCLUSIONES

1. Las hojas del *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” presentan taninos, flavonoides, alcaloides, aminoácidos, saponinas y azúcares reductores.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal peruano” no presenta toxicidad aguda; pero tuvo un efecto secundario que se manifiesta con pérdida de peso en el animal y en los órganos evaluados.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels demostró tener actividad cicatrizante a las dosis ensayadas.
4. La dosis óptima del extracto hidroalcohólico fue de 400mg/kg, obteniéndose 91.72% de efecto cicatrizante respecto al control.

VII. RECOMENDACIONES

- 1. Identificar y aislar los metabolitos secundarios específicos presentes en el extracto hidroalcohólico y probar su actividad cicatrizante.**
- 2. Realizar estudios histológicos de los órganos evaluados para observar algún efecto tóxico.**
- 3. Evaluar la toxicidad dérmica del extracto hidroalcohólico**
- 4. Formular un preparado galénico para ser utilizado como cicatrizante.**

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Arroyo, J; Pareja, B; y Ruez, J. 1999.** Efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* sobre lesiones de piel inducidas en animales de Experimentación. Tesis. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima.
2. **Basto, R. 2001.** Hierbas Medicinales y sus Propiedades Medicinales <http://www.cinavarra.com>. México.
3. **Bustamante, P. 2006.** La Magia de las Plantas Medicinales.- Editorial Soporte Gráfico Inmediato. Lima.
4. **Bruneton, J. 1991.** Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acribia S. A. Zaragoza-España.
5. **Carhuallanqui, M. 2003** Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y Acuosa de *Juglans neotropica* Diels nopal; sobre cepas de *salmonella spp.* Tesis. UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho-Perú.
6. **Chanhualla, W. 2004.** Actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels nopal Peruano en bacterias Gram positivas causantes de infecciones respiratorias agudas. Tesis. UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-Perú.
7. **Cordova, M. 2001.** Plantas Medicinales, Boletín N° 14. Httm. <http://www.cinavarra.com>. México.
8. **Cornejo, A. 1981.** Plantas Tintóreas de la Provincia de Huamanga y su Aplicación en la Artesanía Textil. Dirección Universitaria de Investigación. UNSCH. Ayacucho-Perú
9. **Cornejo, A. 1986.** Las Plantas y sus Utilidades. Dirección Universitaria de Investigación. UNSCH. Ayacucho-Perú.
10. **Cotillo, P. 1998** Farmacología Mecanismos de Acción. UNSCH. Ayacucho.
11. **Cotran, R. 1998.** Patología Estructural y Funcional. 5^{ta} Edic. Volu. I. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. España.
12. **CYTED. 1995.** Manual de Técnicas de Investigación. Subprograma X. Proyecto X-1. Búsqueda de principios bioactivos en plantas de la región. Madrid.
13. **Desmarchelier, C. y Witting F. 2000.** Sesenta Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana, Ecología, etnomedicina y bioactividad. Impreso en el Perú.

14. **Falabella, R. 1994.** Dermatología. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín-Colombia.
15. **Ferreira, L. 1982.** Flora del Perú. Dicotiledóneas. Lima.
16. **Font Quer, P. 1980.** Plantas Medicinales. Editorial. Ateneo España.
17. **Gupta, M. 1995.** 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. CYTED (programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo) Santafé de Bogota.
18. **Harrison, P. 1983.** Farmacognosia I. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.
19. **Hernández J. 1991.** Manual de Patología Veterinaria. UNMSM. Lima-Perú.
20. **Howes, E; Sooy, J; y Harvey, S. 1929.** The healing of wound as determined by their tensile strength. J.A.M.A.
21. **Jaramillo, S. 1989** Naturismo como Sistema Sanitario Social. Barcelona: Léima.
22. **Lojan, L. 1992.** El Verdor de los Andes. Proyecto de Desarrollo Forestal Participativo en los Andes. Quito.
23. **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA, 1993.** Regulaciones Metodológicas para la Evaluación Preclínica de Medicamentos. Editorial Ciencias Médicas. La Habana.
24. **Miranda, M. y Cuellar A. 2001.** Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela. La Habana.
25. **Muñoz, A. 1994** Plantas Medicinales. Editorias Tercer Mundo S.A. Colombia.
26. **Parakrama, T. 1998.** Patología General. 2^{da} Edición. Editorial Manual Moderno. México D.F.
27. **Planas, MC. 1984.** Caracterización de la Actividad Biológica del alcaloide taspina del latex de *Croton lechleri*, Tesis Ciencias U.P.C.H. Facultad de Biología. Lima.
28. **Porturas, M. (1982),** Estudio Farmacográfico del *Juglans neotrópica* Diels o nogal peruano. Tesis. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima.
29. **Rodríguez, E. 2004.** Resumen del Curso Intervención de Toxicología Experimental. U.N.M.S.M. Octubre. Lima.
30. **Romero M. & De la Cruz, J. 1997.** Estudio Etnobotánico de Plantas Medicinales con Propiedades Gastrointestinales en la Provincia de Huamangaⁿ. Informe Final. TICB. UNSCH. Ayacucho.

31. **Wagner, H. y Blatt, S. 1996.** Plant Drug Analysis a thin Layer Chromatography Atlas. 2^{da} Edic. Editorial Springer. Heidelberg-Alemania.
32. **Wallace, H. 1989.** Principles and Methods of Toxicology. 2^{da} Edic. New York-Usa.
33. **Vander, A. 1972.** Plantas Medicinales, las Enfermedades y su Tratamiento por las Plantas. Editorial Sintesis. Barcelona.
34. **Villegas, L; Fernandez, I; Maldonado, H; Torres, R; Zavaleta, A; y Vaisberg, A. 1997,** Evaluation of the wound. Healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. J of Ethnopharmacol.

ANEXOS

ANEXO N° 01

CUADRO N° 2. Análisis de Varianza de la resistencia a la tensión por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Resistencia a la tensión(mi)	4438.983	4	1109.746	141.922	.000
Intra-grupos	156.388	20	7.819		
Total	4595.371	24			

ANEXO N° 02

CUADRO N° 3. Análisis de Varianza de la variación de peso por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Variación de Inter-grupos	142.703	3	47.568	35.245	.000
Intra-grupos	26.992	20	1.350		
Total	169.696	23			

ANEXO N° 03

CUADRO N° 4. Análisis de varianza factorial de la variación de peso según el sexo por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho - 2005.

ANOVA

	Método Único				
	suma de cuadrados	gl	media cuadrática	F	Sig.
Variación de peso(g)					
Covariables					
Efectos principales					
Modelo	.934	1	.934	.681	.419
Residual	142.703	3	47.568	34.684	.000
Total	143.638	4	35.909	26.183	.000
	26.058	19	1.371		
	169.696	23	7.378		

a. Variación de peso(g) por Tratamiento con sexo

b. Todos los efectos introducidos simultáneamente

ANEXO N° 04

CUADRO N° 5. Análisis de varianza de la variación de peso del hígado de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Peso (g)					
Inter-grupos	177.845	3	59.282	518.294	.000
Intra-grupos	2.288	20	.114		
Total	180.133	23			

ANEXO N° 05

CUADRO N° 6. Análisis de varianza de la variación de peso del corazón de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
peso (g)					
Inter-grupos	2.039	3	.680	308.715	.000
Intra-grupos	4.402E-02	20	2.201E-03		
Total	2.083	23			

ANEXO N° 06

CUADRO N° 7. Análisis de varianza de la variación de peso de los pulmones de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
peso (g)					
Inter-grupos	9.542	3	3.181	95.081	.000
Intra-grupos	.669	20	3.345E-02		
Total	10.211	23			

ANEXO N° 07

CUADRO N° 8. Análisis de varianza de la variación de peso de los riñones de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
peso (g)					
Inter-grupos	20.258	3	6.753	2128.395	.000
Intra-grupos	6.345E-02	20	3.173E-03		
Total	20.321	23			

ANEXO N° 08

CUADRO N° 9. Análisis de varianza de la variación de peso del bazo de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
peso (g)					
Inter-grupos	.895	3	.298	180.880	.000
Intra-grupos	3.299E-02	20	1.650E-03		
Total	.928	23			

ANEXO N° 09

CUADRO N° 10. Prueba de Tukey de la resistencia a la tensión por efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

Resistencia a la tensión(ml)

HSD de Tukey ^a	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Tratamientos				
Blanco	5	19.2340		
100 mg/kg	5	19.6340	36.1480	
200 mg/kg	5			
400 mg/kg	5			46.9100
Cicntrín	5		1.000	51.1460
Sig.		.999		.158

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000

ANEXO N° 10

CUADRO N° 11. Prueba de Tukey de la variación de peso por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

Variación de peso (g)

HSD de Tukey	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
2000 mg	6	-4.955367		
200 mg/kg	6	-3.818200	-3.818200	
50 mg/kg	6		-2.837850	
Blanco	6			1.488367
Slg.			.478	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANEXO N° 11

CUADRO N° 12. Prueba de Tukey de la variación de peso del hígado por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

HSD de Tukey	a		Peso (g)
	N	Subjet for alpha = .05	
tratamientos			
2000 mg/kg	6	.564273	1
200 mg/kg	6	.648983	2
50 mg/kg	6	.762817	
blanco	6		
Sig.		.742	6.943167
			1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANEXO N° 12

CUADRO N° 13. Prueba de Tukey de la variación de peso del corazón por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

peso (g)

a

HSD de Tukey	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
tratamientos			
2000 mg/kg	6	8.23E-02	
200 mg/kg	6	.109633	
50 mg/kg	6	.137150	
blancc	6		.781250
Sig.		.212	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANEXO N° 13

CUADRO N° 14. Prueba de Tukey de la variación de peso de los pulmones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

HSD de Tukey	N	peso (g)	
		1	2
tratamientos			
2000 mg/kg	6	.120117	
200 mg/kg	6	.164050	
50 mg/kg	6	.212867	
blanco	6		1.619867
Sig.		.816	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANEXO N° 14

CUADRO N° 15. Prueba de Tukey de la variación de peso de los riñones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

HSD de Tukey	a		peso (g)	
	N		1	2
tratamientos				
2000 mg/kg	6		.167067	
200 mg/kg	6		.174233	
50 mg/kg	6		.218550	
blanco	6			2.307850
Sig.			.410	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANEXO N° 15

CUADRO N° 16. Prueba de Tukey de la variación de peso del bazo por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

HSD de Tukey	N	peso (g)	
		1	2
tratamientos			
2000 mg/kg	6	5.67E-02	
200 mg/kg	6	6.46E-02	
50 mg/kg	6	8.55E-02	
blanco	6		.514283
Sig.		.616	1.000

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

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000

ANEXO N° 16



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

CERTIFICA

Que, el Sr. **Juan Beto, RUIZ ORÉ**, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Engler and Prantl, modificado por Melchior en 1904, y es como sigue:

DIVISIÓN	:	ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)
CLASE	:	DICOTILEDONEAE
SUBCLASE	:	ARCHYCLAMIDEAS
ORDEN	:	JUGLANDALES
FAMILIA	:	JUGLANDACEAE
GENERO	:	<i>Juglans</i>
ESPECIE	:	<i>Juglans neotropica</i> Diels..
N.V.	:	“nogal”

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

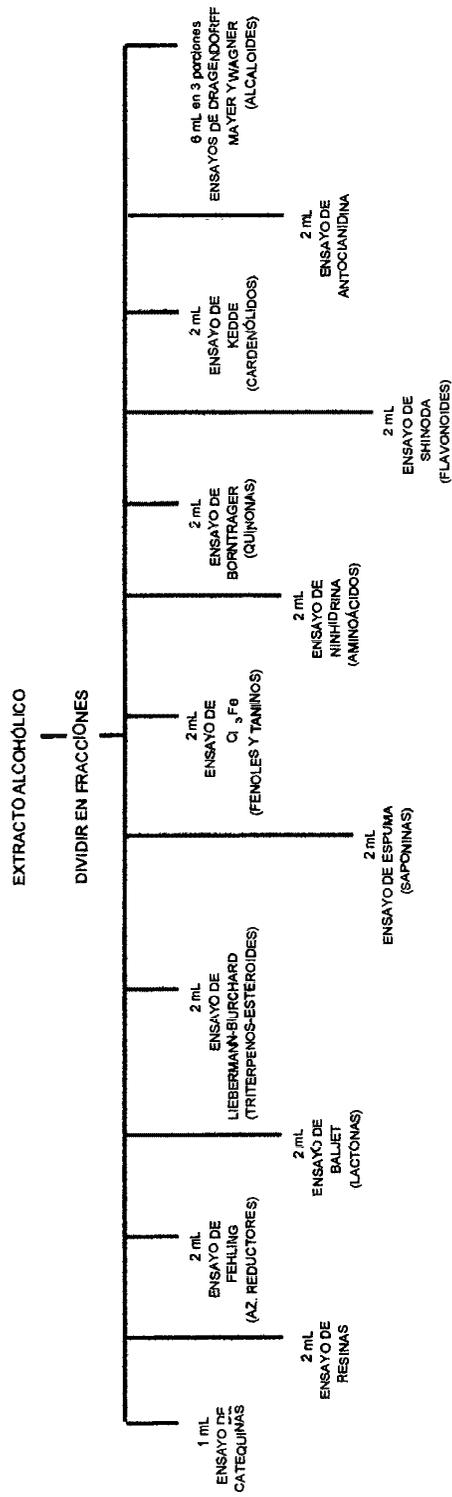
Ayacucho, 28 de Septiembre del 2005.

Herbarium Huamangensis



Jefe

ANEXO N° 17

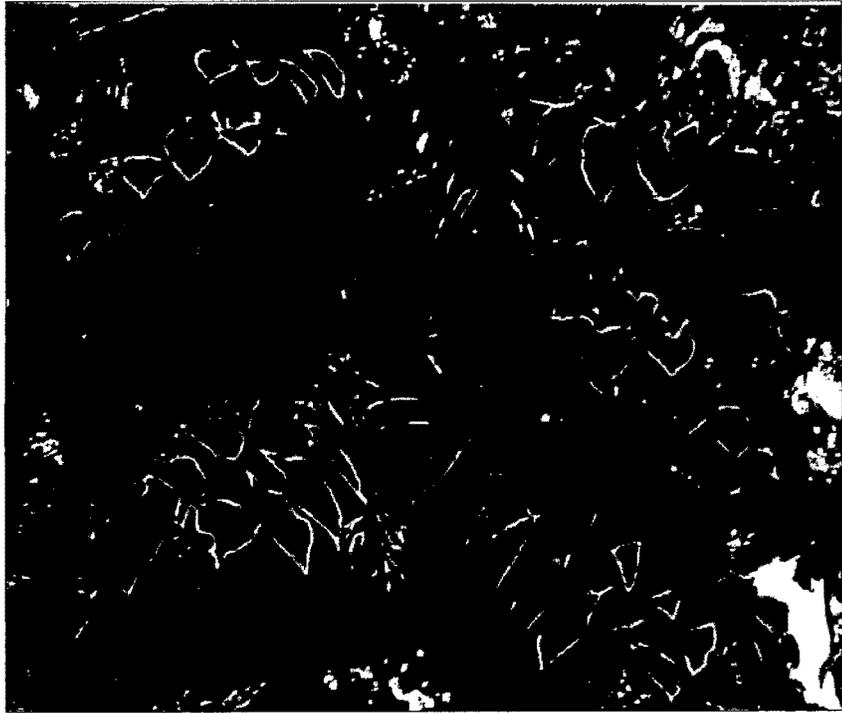


Esquema de las reacciones realizadas en el extracto hidroalcohólico

Fuente: Miranda y Cuéllar, 2000.

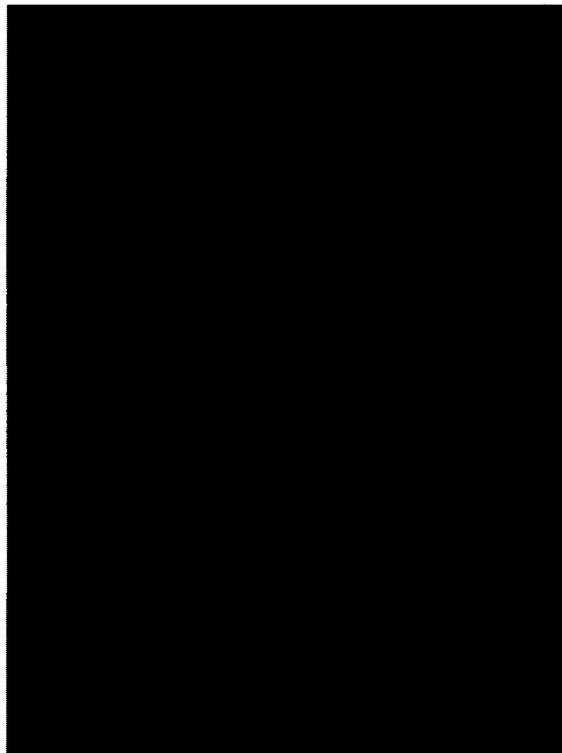
ANEXO N° 18

Juglans neotropica Diels. "nogal peruano".



ANEXO N° 19

Cromatografía en capa fina del extracto del extracto hidroalcohólico al 80% de *Juglans neotropica* Diels. "nogal peruano".



ANEXO N°20

Peso de órganos internos de ratones machos transcurridos 14 días luego de la administración del extracto hidroalcohólico al 80% de *Juglans neotropica* Diels. "nogal peruano".

HIGADO		CORAZÓN		PULMÓN		RINÓN		BAZO	
50 mg/kg									
R1	0.8333	R1	0.1538	R1	0.2095	R1	0.2387	R1	0.1044
R2	0.9612	R2	0.1739	R2	0.1685	R2	0.2876	R2	0.0956
R3	0.8493	R3	0.1591	R3	0.2965	R3	0.1780	R3	0.0925
200 mg/kg									
R1	0.7656	R1	0.1448	R1	0.2089	R1	0.2148	R1	0.0787
R2	0.7072	R2	0.0816	R2	0.2204	R2	0.0986	R2	0.0843
R3	0.6022	R3	0.1072	R3	0.1486	R3	0.1876	R3	0.0321
2000 mg/kg									
R1	0.6338	R1	0.0925	R1	0.1984	R1	0.2187	R1	0.0533
R2	0.6051	R2	0.0963	R2	0.1245	R2	0.2433	R2	0.0671
R3	0.6842	R3	0.0894	R3	0.0984	R3	0.2409	R3	0.0497
Blanco									
R1	7.4469	R1	0.8375	R1	1.2548	R1	2.1007	R1	0.5847
R2	7.8233	R2	0.8798	R2	1.9852	R2	2.3458	R2	0.5742
R3	7.0347	R3	0.6923	R3	2.0547	R3	2.2983	R3	0.5912
R4	6.3508	R4	0.8549	R4	0.9865	R4	1.9815	R4	0.4679
R5	7.3474	R5	0.7052	R5	1.584	R5	2.3584	R5	0.5657

ANEXO N° 21

Peso de órganos internos de ratones hembras transcurridos 14 días luego de la administración del extracto hidroalcohólico al 80% de *Juglans neotropica* Diels. “nogal peruano”.

HIGADO		CORAZON		PULMON		RINON		BAZO	
50 mg/kg									
R1	0.5989	R1	0.0942	R1	0.0940	R1	0.2402	R1	0.0906
R2	0.6076	R2	0.1325	R2	0.2366	R2	0.1887	R2	0.0780
R3	0.7266	R3	0.1094	R3	0.2721	R3	0.1781	R3	0.0521
200 mg/kg									
R1	0.6123	R1	0.0992	R1	0.1914	R1	0.1923	R1	0.0658
R2	0.7019	R2	0.1047	R2	0.0936	R2	0.1065	R2	0.0583
R3	0.5047	R3	0.1203	R3	0.1214	R3	0.2456	R3	0.0681
2000 mg/kg									
R1	0.5004	R1	0.0724	R1	0.0977	R1	0.0983	R1	0.0540
R2	0.4451	R2	0.0697	R2	0.0953	R2	0.1032	R2	0.0713
R3	0.5174	R3	0.0732	R3	0.1064	R3	0.0980	R3	0.0449
Blanco				BLANCO					
R1	6.0021	R1	0.6968	R1	1.4606	R1	2.2852	R1	0.4215
R2	6.8041	R2	0.7251	R2	0.8647	R2	1.9151	R2	0.4356
R3	6.5479	R3	0.6924	R3	1.7075	R3	2.3143	R3	0.3558
R4	5.2493	R4	0.7476	R4	1.2564	R4	2.2451	R4	0.4870
R5	6.0245	R5	0.5942	R5	0.7391	R5	1.9143	R5	0.3268

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.</p>	<p>¿Tendrá algún efecto tóxico y cicatrizante el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal peruano"?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar el efecto tóxico y cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal peruano". <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico mediante pruebas químicas y cromatográficas. • evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal peruano". • Precisar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal peruano", que muestre una mayor eficiencia cicatrizante. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Juglar neotropica</i> Diels "nogal peruano" • Clasificación sistemática • Características • Habitat • Usos • Toxicidad • Toxicidad aguda • Toxicidad sub aguda • Toxicidad crónica • Cicatrización • Fases de la cicatrización • Mecanismos implicados en la cicatrización. 	<p>El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal" no tiene efecto tóxico pero si posee efecto cicatrizante.</p>	<p>Variable Independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal".</p> <p>Variable Dependiente: El efecto cicatrizante de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal"</p> <p>Relación Entre Variables La actividad cicatrizante depende de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal".</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> -Diferentes concentraciones (2000 mg/Kg.; 200 mg/Kg. y 50 mg/Kg.). - Dias administrados con las distintas concentraciones. - cantidad de ratones muertos. - Volumen de agua que rompe la tensión de la herida. -Diferentes concentraciones (2000 mg/Kg.; 200 mg/Kg. y 50 mg/Kg.). - Dias administrados con las distintas concentraciones. - cantidad de ratones muertos. - Volumen de agua que rompe la tensión de la herida. 	<p>Población: Estará constituida por las hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal" en un estado de madurez, con presencia de inflorescencias y frutos, obtenida en la Localidad de Azángaro Provincia de Huanta, situada aproximadamente a los 2500 m.s.n.m.</p> <p>Muestra: Estará constituida por: 5 Kg. hojas de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal", las cuáles son obtenidas en la localidad ya mencionada a mediados del mes de Enero, en un estado de madurez, con presencia de inflorescencias y frutos.</p> <p>Método: Toxicidad a Dosis Limite. Se realizará por el método de dosis limite donde la dosis máxima utilizada será de 2000mg/Kg. donde se usaran ratón albino 10 por sexo/grupo, al ratón albino se le administrara 1mL/20g de peso y a las ratas albinas 3mL/100g de peso y estarán en ayuno por 12 horas luego evaluaremos la mortalidad en 24 horas. (Rodríguez, E. 2004).</p> <p>Test de cicatrización por el metodo de Howes E.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.-Se depilará el lomo y pesara a los ratones. 2.-Se anestesia al animal. 3.-Se afronta los bordes de la herida con un punto de sutura de nudo triple. 4.-Se administrará la 1ra. Dosis del tratamiento. Esto se repite cada 12 hrs. 5.-Pasadas las 48 hrs. se procederán a sacrificar al ratón con una sobredosis de Fenobarbital sódico. 6.- Al sacrificio, se quitará el punto de sutura y se coloca sobre el aparato de tensión. 7.-Luego se determinará el porcentaje de la actividad cicatrizante.

Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

Juan Beto Ruiz O.¹ Enrique Aguilar F²

¹ Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica - Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

² Laboratorio de farmacognosia y farmacología - Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue demostrar la toxicidad y efecto cicatrizante de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Las hojas fueron colectadas en los meses de febrero a marzo del 2005 en la localidad de Azángaro, provincia de Huanta en Ayacucho, Perú, a 2500 m.s.n.m., luego de su identificación taxonómica, las hojas fueron desecadas a temperatura ambiente y luego se preparó el extracto hidroalcohólico al 80%.

La toxicidad aguda oral del extracto hidroalcohólico se demostró mediante el método de dosis límite en ratones albinos de ambos sexos, con dosis crecientes de 50, 200, 2000 mg/kg; los animales fueron observados durante 14 días sin producirse ninguna mortalidad; entonces fueron sacrificados y se evaluó la reducción del peso de los órganos internos presentando diferencias significativas ($p < 0.05$), deduciendo que la toxicidad es independiente del sexo. Por otro lado, la actividad cicatrizante se determinó "in vivo", como en los ensayos para toxicidad. Se empleó el Test de Howes; a la dosis variantes de 100, 200, 400 mg/kg, El mayor efecto cicatrizante se logró a 400 mg/kg (91.72%), con respecto al estándar (Cicatrín) (100%) encontrándose diferencias significativas.

El tamizaje Fitoquímico reporta la presencia de taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, aminoácidos y azúcares reductores.

A la luz de los resultados es posible concluir que el extracto hidroalcohólico de las hojas de la planta bajo estudio, posee ambas propiedades tanto la toxicidad como la propiedad cicatrizante.

Palabras clave: *Juglans neotropica* Diels, toxicidad aguda, actividad cicatrizante.

ABSTRACT

The objective of this study was to show toxicity and cicatrizant effect of *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Juglans leaves were collected during February – March 2005, in Azangaro locality, Huanta province in Ayacucho, Perú, at 2,500 m of elevation; after that the plant was submit to taxonomical identification, later, leaves were dried at room temperature and then prepare hydroalcoholic extract at 80%.

The acute oral toxicity of leaves extract was tested by limit dose method, on both sexes white mice, including one control group, using three varying dose: 50, 200 y 2000 mg/kg. Animals were observed for 14 days, and it did not produce any mortality; then mice were sacrificed and measured how much their internal organs had lowering, verifying significant difference respect to control group ($p < 0.05$), likewise, toxicity was independent about sexes. On the other hand, cicatrizing activity was essayed by Howes' test, "in vivo", like the first test: once an injury by incision in mice's loin made; the extract was applied at 100, 200 and 400mg/kg, when we observed that the best effect was at 400 mg/kg (91.72%) compared to standard drug (cicatrín) (100%), which represented a significant difference.

Phytochemical screening reported the presence of: tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, aminoacids, and reducing sugars. From results it is possible conclude that the leaves under study possess both properties toxicity and cicatrizing activity.

Key words: *Juglans neotropica* Diels, acute toxicity, cicatrizing activity

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional, es utilizada ampliamente y desde tiempos ancestrales en nuestro país. El conocimiento sobre salud, enfermedad, prevención y tratamiento; ha sido transmitido de una generación a otra, a través del tiempo. Este saber se basa exclusivamente en la experiencia y las observaciones. La planta *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", es de uso frecuente como especie medicinal en casi toda la sierra del Perú, y en algunas zonas de la selva; en este sentido es necesario estudiar científicamente sus efectos con el fin de permitir su uso racional.

Las plantas medicinales constituyen un remedio curativo empleado desde la antigüedad por el hombre. Esta práctica es de gran importancia ya que amplía el arsenal terapéutico y carece de efectos significativos.

Juglans neotropica Diels "nogal peruano", es utilizado tradicionalmente para curar afecciones bronquiales, tratamiento de diarrea, cicatrizantes de heridas y llagas, úlceras, diabetes, catarros, inflamaciones y úlceras de la boca¹⁰.

El presente trabajo de investigación busca contribuir al conocimiento de las bondades de esta especie medicinal para su futuro uso racional, sobre todo ahora que se observa un retorno cada vez mayor, al uso de las plantas medicinales en la terapia, para lo cual se trazo el siguiente objetivos general:

- Evaluar el efecto tóxico y cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Además se planteó los siguientes objetivos específicos:

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico mediante pruebas químicas y cromatográficas.
- Evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".
- Precisar la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano", que muestre una mayor eficiencia cicatrizante.

Correspondencia:

Juan Beto Ruiz Oré. (Poi:son106@hotmail.com)
Fac. Cs. Biológicas. UNSCH. Ciudad Universitaria. Av. Independencia s/n.
Telf.: (066) 31-2510 anexo 145
biunsch_decano@latinmail.com



Juglans neotropica Diels "nogal peruano."

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, ubicada en la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una altitud de 2750 m.s.n.m., durante los meses de marzo a junio del año 2005.

El extracto hidroalcohólico al 80% de las hojas fue preparado por maceración³, la marcha fitoquímica se realizó siguiendo la metodología de Miranda y Cuéllar⁷.

La toxicidad aguda se evaluó mediante el método de dosis límite, se emplearon 24 ratones albinos de ambos sexos procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS) con una masa corporal de 18 a 22 g. Se confeccionaron grupos de 6 animales (3 de cada sexo), el extracto se administró en dosis únicas mediante sonda orogástrica, retirándose la comida 6 horas antes. En los tres primeros grupos se administraron dosis respectivas de 50, 200 y 2000 mg/kg, el cuarto grupo sólo recibió carboximetilcelulosa al 1%. Los ratones fueron observados durante 14 días, registrando cualquier síntoma tóxico, al finalizar este periodo se procedió al sacrificio mediante dislocación cervical para realizarles el examen macroscópico y la comparación de pesos de 5 tipos de órganos.

En el estudio farmacológico, se utilizaron ratones machos de 18-22 g de peso distribuidos aleatoriamente en número de 4, constituyendo 5 grupos: Se depiló el lomo a los ratones en un área aproximada de 2 cm², 24 hrs. antes del Test, con el fin de descartar una reacción alérgica a la crema depiladora.

1. Se pesó los ratones.
2. Se anestesió al animal con Fenobarbital Sódico, por Vía Intraperitoneal.
3. Luego de desinfectar el área depilada se realizó una incisión de 1 cm. de largo en el tercio del lomo.
4. Se afrontó los bordes con un punto de sutura de nudo triple.
5. Se administró en forma tópica la 1ra. dosis del tratamiento (El extracto hidroalcohólico al 80% se resuspendió en carboximetilcelulosa al 1%).

se repite cada 12 horas.

6. Pasadas las 96 hrs. se procedió a sacrificar al ratón.
7. Posteriormente al sacrificio, se quitó el punto de sutura y se colocó al animal en posición de cubito ventral sobre el aparato de tensión.
8. Se insertó las agujas del aparato de Tensión a 0.50 cm. de los bordes de la herida y se empleó una bureta (previamente enrasada con agua destilada) para dejar caer el líquido al vaso hasta que se genera una tensión que abre la herida en toda su longitud.
9. Se anotó el nivel alcanzado.
10. Luego se determinó el porcentaje de la actividad cicatrizante.

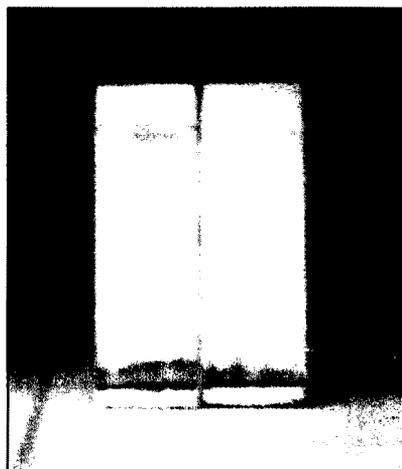
Los resultados son presentados en forma de tablas, gráficos de barra de error, histograma y serán contrastados con la prueba estadística del análisis de varianza y la prueba de comparación múltiple de Tukey al 95 % de confianza.

RESULTADOS

Cuadro N° 01: Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico al 80% de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano" ..

Metabolitos	Pruebas	Resultados	Características
alcaloides	Dragendorff	+++	Naranja
	Mayer	+++	Blanco
	Hager	++	Blanco
	Wagner	++	Marrón
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+++	Azul oscuro
Flavonoides	Shinoda	++	Rojo
Azúcares reductores	Fehling	+	Rojo
Saponinas	Espuma	+	Espuma
Aminoácidos	Ninhidrina	+	Violeta
Aceites	Sudan III	-	-
Antraquinonas	Borntreger	-	-

Positivos:(+) leve, (++) moderado, (+++) abundante;
Negativo: (-)



Fotografía 01: Taninos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

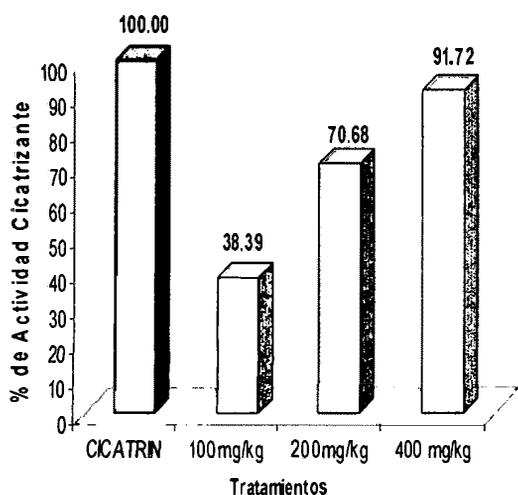


Gráfico 01: Porcentaje de actividad del efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

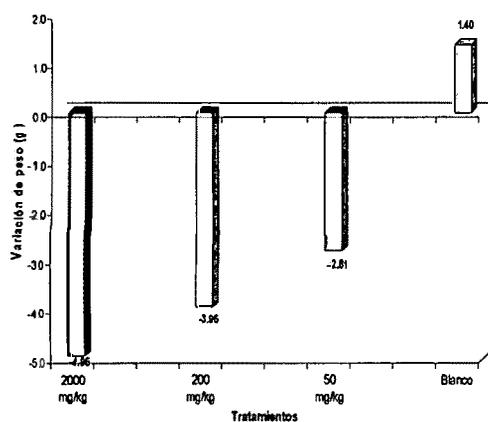


Gráfico 02: Variación de peso por efecto del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

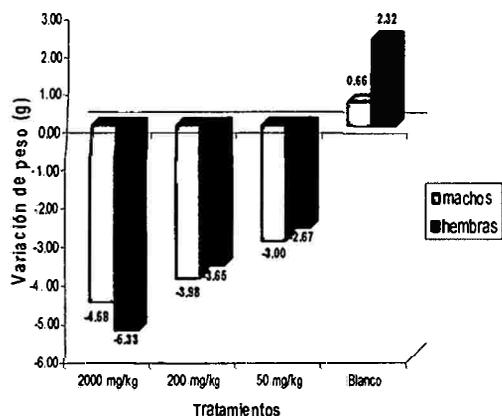


Gráfico 03: Variación de peso según el sexo por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Ayacucho-2005.

Cuadro N° 02: Niveles de significación en el análisis de varianza durante la determinación de la toxicidad del extracto hidroalcohólico al 80% de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano".

Peso	Tipo de tratamiento	Tipo de ANOVA	P
Corporal	TRATAMIENTOS según SEXO	2 factores	0.419
órganos internos	HÍGADO	1 factor	0.000
	BAZO		0.000
	CORAZÓN		0.000
	PULMONES		0.000
	RIÑONES		0.000

DISCUSIÓN

En la Cuadro N° 01 se observa que el extracto hidroalcohólico de nogal tiene los siguientes metabolitos secundarios: taninos, flavonoides y alcaloides, en menos porcentaje encontramos aminoácidos, saponinas y azúcares reductores, Carhuallanqui³, además se encontró en el trabajo realizado otros metabolitos secundarios como antraquinonas, triterpenos y esteroides, lactonas y cumarinas.

A cada uno de los metabolitos secundarios se destaca una función específica. Harrison⁶, menciona que los taninos tiene la propiedad de precipitar las proteínas formando tanatos de proteínas insolubles, originando un efecto antimicrobiano, antifúngico y antiséptico; de igual manera Cordova⁵, define que la acción de los taninos se combinan con las proteínas de la piel y de la mucosa compuestos insolubles. Eliminan por lo tanto la base del cultivo a las bacterias que intentan colonizar la piel y las mucosas, evitando así la putrefacción, además interaccionan con los alcaloides que en presencia de los taninos precipitan, de igual manera Muñoz⁸, reitera que los taninos tienen la propiedad de fijarse a las proteínas formando complejos. Su propiedad de astringencia se emplea en el uso externo como cicatrizante y el tratamiento de heridas, esta propiedad esta ligada, a su capacidad para unirse a las proteínas de la piel y de las mucosas, provocando una especie de curtido, haciendo que las capas superficiales sean menos permeables y protejan a las capas subyacentes.

En la Fotografía 01 se evidenció la presencia de taninos por la coloración azul oscuro de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano". Posiblemente sean del tipo de tanino gálico por la coloración azul característica².

Adicionalmente de modo general podemos decir que se trata de compuestos fenólicos como los flavonoides.

Los flavonoides protegen el daño tisular neutralizando los radicales libres producidos por el neutrófilo en el sitio de la inflamación².

En el Gráfico 01, se observa el porcentaje de actividad cicatrizante, en donde el control (Cicatrin) se considera con un 100 % de actividad y la dosis de 400 mg/kg tiene un 91.72 % de actividad por tanto, podemos inferir que tienen un porcentaje de actividad semejante. Asimismo, el control tiene una formulación con antibióticos (Sulfato de neomicina, bacitracina, glicina) quienes actúan sinérgicamente en el proceso de cicatrización.

El extracto hidroalcohólico esta constituido por varios metabolitos secundarios arriba descritos (Cuadro N° 01). La literatura refiere que los taninos son astringentes y precipitan proteínas; es decir permiten la regeneración de la piel; además concomitantes tienen actividad bactericida y bacteriostática sobre una serie de microorganismos, demostrado por Carhuallanqui y

Chanhualla^{3,4}; por ende impiden el desarrollo de procesos infecciosos.

Los flavonoides, son conocidos por tener actividad antioxidante por ser polifenoles que atrapan radicales libres; por tanto, impiden procesos necróticos y la potenciación de los procesos inflamatorios; además también tienen actividad antibacteriana².

Se podría afirmar que en los procesos de cicatrización intervienen simultáneamente los agentes que producen astringencia, precipitan proteínas, neutralizan los radicales libres, inhiben mediadores de la inflamación e impiden el crecimiento microbiano como son los taninos y flavonoides.

En el Perú se realizaron estudios para evaluar el efecto cicatrizante de plantas medicinales utilizando el método tensiométrico⁹, y corroborando el método tensiométrico con estudios histológicos¹.

En el Gráfico N° 02 asumimos en cuanto a la masa corporal se observó una disminución escalonada a mayor dosis mayor disminución de peso; el de 50mg/kg (-2.81 g); de 200mg/kg (-3.95 g); 2000mg/kg (-4.95 g); en cambio en grupo control hubo un aumento (1.40 g). Al realizar el Anova (Cuadro N° 3) se encontró una significancia menor a 0.05, que indica que hubo diferencias estadísticamente significativas en la variación de peso teniendo en cuenta los tratamientos administrados.

Uno de los indicadores de toxicidad es el control del peso al inicio y al final del ensayo, al no existir ganancia de peso similar al control, significa que existe algún grado de toxicidad, que podría deberse a un proceso de estreñimiento crónico producto del efecto astringente de los taninos presentes en el extracto, pero no hay muerte durante los 14 días.

En el Gráfico N° 03 se observa la variación de peso según el sexo por efecto de los tres dosis ensayadas, en donde no existe diferencias en cuanto al sexo, es decir, que ambos machos y hembras sufren los mismos efectos y pierden peso por efecto de los tratamientos; esto es corroborado por el análisis de varianza múltiple (Cuadro N° 04); en donde existe significancia estadística en dosis; pero no en cuanto al sexo. Podemos afirmar que los efectos secundarios, son independientes del sexo.

En el Cuadro N° 02 avalan las diferencias estadísticas encontradas, en los que además la toxicidad es dependiente de la dosis, donde encontramos que existe diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos con el grupo control ($p < 0.05$).

Durante el análisis macroscópico de los órganos internos no se encontró modificaciones en cuanto al color, textura y forma; aparentemente el peso fue el único parámetro afectado, se debe considerar un análisis microscópico que podría revelar modificaciones estructurales en la histología de los órganos.

CONCLUSIONES

1. Las hojas del *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano" presentan taninos, flavonoides, alcaloides, aminoácidos, saponinas y azúcares reductores.
2. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal peruano" no presenta toxicidad aguda; pero tuvo un efecto secundario que se manifiesta con pérdida de peso en el animal y en los órganos evaluados.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels demostró tener actividad cicatrizante a las dosis ensayadas.
4. La dosis óptima del extracto hidroalcohólico fue de 400mg/kg, obteniéndose 91.72% de efecto cicatrizante respecto al control.

AGRADECIMIENTOS

Al Q.F. Enrique Aguilar y M.g. Aldo Tinco Jayo por su apoyo durante la ejecución del estudio toxicológico y farmacológico por su ayuda en el suministro de materiales y reactivos para el estudio químico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arroyo, J; Pareja, B; y Ruez, J. 1999. Efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* sobre lesiones de piel inducidas en animales de Experimentación. Tesis. UNMSM. Lima.
2. Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acirbia S.A. Zaragoza, España.
3. Carhuallanqui, M. 2003 Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y acuosos de *Juglans neotropica* Diels nogal; sobre cepas de *salmonella* spp. Tesis. UNSCH. Ayacucho.
4. Chanhualla, W. 2004. Actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels nogal Peruano en bacterias Gram positivas causantes de infecciones respiratorias agudas. Tesis. UNSCH. Ayacucho.
5. Cordova, M. 2001. Plantas Medicinales, Boletín N° 14. Httm. <http://www.cinavarra.com.México>.
6. Harrison, P. 1983. Farmacognosia I. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima.
7. Miranda, M. y Cuellar A. 2001. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. La Habana.
8. Muñoz, A. 1994 Plantas Medicinales. Editoriasl tercer Mundo S.A. Colombia.
9. Planas, MC. 1984. Caracterización de la Actividad Biológica del alcaloide taspina del latex de *Croton lechleri*, Tesis de Bachiller en Ciencias U.P.C.H. Lima.
10. Vander, A. 1972. Plantas Medicinales, las enfermedades y su tratamiento por las plantas. Editorial Sintet. Barcelona.

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. JUAN BETO RUIZ ORÉ

R.D.Nº 003-2007-FCB-D.

En la ciudad de Ayacucho, a los ocho días del mes de Febrero del año dos mil siete, siendo la tres de la tarde; reunidos en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, los miembros del Jurado Calificador del Acto Público de Sustentación de Tesis, bajo la Presidencia (e) de Q.F. Emilio Germán Ramírez Roca, por encargo del Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas y cuyos miembros integrantes son: M.g. Marco Rolando Arones Jara, Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices, M.g. Jhonny Aldo Tinco Jayo y Q.F. Edgar Cárdenas Landeo, como Secretario lo hace Q.F. Edgar Cárdenas Landeo por encargo, todos reunidos con la finalidad de decepcionar la Tesis presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica JUAN BETO RUIZ ORÉ y cuyo título es **“Evaluación de la toxicidad y efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal Peruano“ Ayacucho-2005.** Después de cumplir la parte formal para iniciar el acto de sustentación, el profesor Q.F. Emilio German Ramírez Roca invita al sustentante a iniciar este acto.

Concluida con la exposición, el encargado de la Presidencia del jurado, invita a los miembros para que puedan hacer sus preguntas y aclaraciones que crean convenientes, es así que cada miembro efectúa sus preguntas las mismas que son respondidas por el sustentante, Juan Beto RUIZ ORÉ, concluido con ello, se invita al sustentante y al público asistente hagan el favor de desocupar el local con la finalidad de que los miembros

del jurado calificador efectúen en privado las deliberaciones y evaluaciones respectivas, cuyos resultados son:

MIEMBROS DEL JURADO	EXPOSICIÓN	PREGUNTAS	
M.g. Marco Rolando Arones Jara	17	17	17
Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices	17	17	17
M.g. Jhonny Aldo Tinco Jayo	16	14	15
Q.F. Edgar Cárdenas Landeo	16	14	<u>15</u>
PROMEDIO FINAL			16

Como resultado de la calificación de la exposición de la tesis, el sustentante obtuvo el promedio aprobatorio de **DIECISEIS (16)** de lo cual se da fe por parte de los miembros del jurado estampando su firma al pie del acta. Este acto de sustentación finaliza siendo las cinco de la tarde con seis minutos.


M.g. Marco Rolando Arones Jara
Miembro


Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices
Miembro-asesor


M.g. Jhonny Aldo Tinco Jayo
Miembro


Q.F. Edgar Cárdenas Landeo
Miembro-Secretario


Q.F. Emilio Germán Ramírez Roca
Presidente (e)