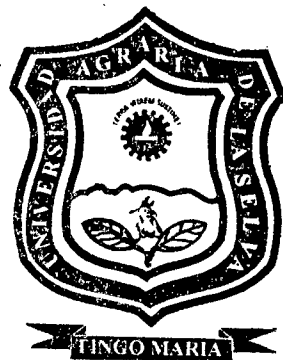


UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

Departamento Académico de Ciencia Animal



**"COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA DE
LA HOJA DE UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa* y
Uncaria guianensis)"**

TESIS

PARA OPTAR EL TITULO DE :

INGENIERO ZOOTECNISTA

Jéssica Vanessa García Masías

PROMOCION 99-II

TINGO MARIA - PERU

2003



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María - Perú

FACULTAD DE ZOOTECNIA

Av. Universitaria Km. 2 Telf. (064) 561280 Fax: (064) 561156 E. Mail faczoot@mail.cosapidata.com.pe

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 19 de Abril del 2001, a horas 07:0 a.m. en la Sala de Grados y Títulos, para calificar la tesis titulada:

" COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDATIVA DE LA HOJA DE UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) "

Presentada por la Bachiller: **JESSICA VANESSA GARCIA MASIAS**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de "MUY BUENO".

En consecuencia la sustentante queda apta para optar el Título de **INGENIERO ZOOTECNISTA**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título de conformidad con lo establecido en el Art. 81 inc. m) del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 30 de abril del 2001

Méd.Vet. DANIEL JUAREZ LARENAS
Presidente

Méd.Vet. TEODOLFO VALENCIA CHAMBA
Vocal



Ing. MARCO ROJAS PAREDES
VOCAL

Ing. JUAN LAZARO GONZALES
Asesor

DEDICADO

A Dios por otorgarme la vida, ser guía, compañero y amigo en el camino de mi formación.

A mis padres JOSÉ Y ROCÍO por el amor, el apoyo constante, sacrificado e incondicional para el logro de mis anhelos.

A mis hermanos Vynzett, George y Lucerito con mucho aprecio y cariño por compartir mis inquietudes.

MI SINCERO AGRADECIMIENTO

- Al Dr. Manuel Sandoval Chacón Ph.D. e Ing. Juan Lao Gonzales, por el asesoramiento, apoyo constante, íntegro y desinteresado; y por la estrecha amistad forjada en la elaboración del presente trabajo de investigación.
- A todos los docentes y trabajadores administrativos de la facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, por la formación y amistad.
- A mis amigos por la amistad sincera e incondicional demostrado en todo momento; Jean Alvarado, Christian Salas, Iris Ruiz, Katia Hurtado, Jenny Santa Cruz y todos quienes siempre los llevo en mi corazón.
- A mis compañeras de cuarto, las joyas; Guessenia Roca y Maribel Quincho, a quienes recordaré con mucho cariño por las experiencias compartidas.
- A la familia Alvarado Agreda por el apoyo desinteresado en muchas oportunidades durante el curso de mi carrera y todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la ejecución del presente trabajo.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN DE LITERATURA	03
2.1 Generalidades de la uña de gato	03
2.1.1 Habitud	03
2.1.2 <i>Uncaria tomentosa</i>	03
2.1.3 <i>Uncaria guianensis</i>	04
2.1.4 Etnomedicina	04
2.1.5 Composición química	05
2.1.6 Propiedades farmacológicas	06
2.2 Radicales libres	08
2.3 Estrés oxidativo	10
2.4 Mecanismos de las respuestas inmunitarias	11
III. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Lugar y fecha de ejecución del trabajo	13
3.2 Materia prima	13
3.3 Materiales y equipos	14
3.4 Tratamientos en estudio	15
3.5 Parámetros evaluados	15
3.6 Metodología de trabajo	16
3.7 Análisis estadístico	18

IV. RESULTADOS	19
4.1 Actividad antioxidativa	19
4.1.1 Inhibición del radical libre, DPPH	19
4.1.2 Inhibición del oxidante peroxinitrito	26
4.2 Determinación de ácido ascórbico, vitamina C	31
V. DISCUSIÓN	32
VI. CONCLUSIONES	36
VII. RECOMENDACIONES	38
VIII. ABSTRACT	39
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	42
X. ANEXOS	47

INDICE DE CUADROS

CUADROS	Página
1. Tratamientos utilizados en la inhibición del DPPH	15
2. Tratamientos utilizados en la degradación del peroxinitrito	15
3. Efecto del extracto acuoso de hoja fresca de <i>Uncaria tomentosa</i> en la inhibición del DPPH	20
4. Efecto del extracto acuoso de hoja fresca de <i>Uncaria guianensis</i> en la inhibición el DPPH	22
5. Comparativo de la actividad inhibitoria del DPPH entre los extractos acuosos de hoja fresca de <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Uncaria guianensis</i>	25
6. Inhibición del oxidante peroxinitrito por efecto del Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	26
7. Inhibición del oxidante peroxinitrito por efecto del Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria guianensis</i>	28
8. Comparativo de la actividad inhibitoria del peroxinitrito entre los extractos acuosos de hoja fresca de <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Uncaria guianensis</i>	30
9. Contenido de vitamina C en extractos acuosos de hoja fresca de uña de gato	31

INDICES DE GRÁFICOS

	Página
1. Curva de degradación del DPPH por acción de Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	20
2. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH con Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	21
3. Coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del DPPH por el Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	21
4. Curva de degradación del DPPH por acción del Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria guianensis</i>	23
5. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH con Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria guianensis</i>	23
6. Coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del DPPH por el Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria guianensis</i>	24
7. Comparativo de la actividad antioxidativa de la <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Uncaria guianensis</i>	25
8. Porcentaje de inhibición del oxidante PN con Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	26
9. Coeficiente de inhibición (IC ₅₀) del oxidante peroxinitrito por el Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	27
10. Porcentaje de inhibición del oxidante peroxinitrito con Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria guianensis</i>	28

11. Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del oxidante peroxinitrito por el Extracto Acuoso de Hoja Fresca de <i>Uncaria guianensis</i>	29
12. Comparativo de la actividad inhibitoria de la <i>Uncaria tomentosa</i> y <i>Uncaria guianensis</i>	30

INDICE DE ANEXOS

1. Determinación de ácido ascórbico (método 2,4 – Dinitrophenylhydrazine)
2. Cuadro de absorbancias (515 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa* al reaccionar con el DPPH (100 μ M).
3. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa*.
4. Cuadro de absorbancias (515 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis* al reaccionar con el DPPH (100 μ M).
5. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis*.
6. Cuadro de absorbancias (302 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa* al reaccionar con el peroxinitrito (1 mM).
7. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa*.
8. Cuadro de absorbancias (302 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis* al reaccionar con el peroxinitrito (1 mM).
9. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis*.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Nutrición – Espectrofotometría, de la facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en la ciudad de Tingo María. El experimento se realizó entre los meses de abril a octubre del 2000. El objetivo fue determinar si los Extractos Acuósos de Hoja de Uña de Gato (EAHUG), *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* poseen bondades antioxidativas. La capacidad antioxidativa del EAHUG fue evaluada utilizando 2 modelos de acción in vitro: 1) Acción de inhibir o secuestrar DPPH (100 μ M), y 2) Acción contra el oxidante nocivo peroxinitrito que es producido en estados de inflamación. El método de secuestro del radical libre 1,1 α -diphenil- β -picrylhidrazyl (DPPH) (100 μ M) haciendo reaccionar con 0, 10, 100, 300, 1000 μ g/ml del EAHUG para ambas especies; las lecturas se realizaron en espectrofotómetro V/UV Shimatzu 1200, cada minuto durante 15 minutos a longitud de onda de 515 nm. En la muestra de 1000 μ g/ml se obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del DPPH; 90.79 % y 91.77 % y un coeficiente de inhibición (IC₅₀) de 47.741 y 42.085 μ g/ml de EAHUG de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*, respectivamente. Para la inhibición del peroxinitrito, previamente se sintetizó el oxidante; se utilizaron 0, 100, 500, 1000 μ g/ml de EAHUG los cuales se hicieron reaccionar con el peroxinitrito (1mM), las lecturas se registraron cada 10 segundos durante 120 segundos a longitud de onda de 302 nm; siendo 1000 μ g/ml la que mostró mayor porcentaje de degradación contra el peroxinitrito con 61.36 y 94.91 % y un coeficiente de

inhibición (CI₅₀) de 774.1 y 396.2 µg/ml de EAHUG de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*, respectivamente. Se concluye que la hoja fresca de uña de gato posee excelentes propiedades para inhibir oxidantes y radicales libres dañinos a la salud, también afirmamos que la actividad antioxidativa de ambas especies son similares; y podemos estimar que la presencia de Acido Ascórbico (vitamina C) no es determinante sobre la propiedad antioxidativa, corroborando que dicha propiedad es una acción sinérgica de varios los componentes de la hoja. Se recomienda utilizar la hoja de uña de gato como preventivo al estrés oxidativo e inflamaciones crónicas generadas en los seres vivos, y continuar la investigación en otros modelos biológicos incluyendo modelos clínicos para su aplicación en las ciencias médicas.

I. INTRODUCCION

La producción intensiva de animales domésticos, los somete a un proceso de estrés oxidativo e inflamaciones crónicas que son propias de este tipo de explotación, por las condiciones de manejo que se aplican como el confinamiento, la densidad de cría, uso continuo de fármacos convencionales, etapa productiva, etc.; este estado genera la producción excesiva de biomoléculas como citokinas y oxidantes (óxido nítrico, peroxinitrito, radical OH, superóxidos). Para superar esta agravante, el organismo como primera línea de acción, recurre a sus reservas de antioxidantes endógenos y el uso de nutrientes para aliviar los efectos negativos.

El criador, para obtener productividad óptima, recurre al uso de fármacos que sin embargo, pueden desarrollar cepas de microorganismos resistentes a las drogas y también tener efectos colaterales para el consumidor. Es por eso que en la actualidad la industria viene introduciendo antioxidantes naturales para coadyuvar a este proceso y tratar de aliviar los factores deletéreos que pueden afectar la producción.

El fenómeno de estrés oxidativo ocurre en la vida diaria de humanos y por lo tanto se viene observando en estos últimos años una gran demanda de plantas medicinales que provean estas bondades.

Por lo tanto la tendencia de incorporar productos naturales que demuestren tener bondades antioxidativas y antiinflamatorias en la producción animal está en aumento. Es bajo este contexto que la Uña de gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) viene siendo propuesta para su uso; sin embargo, se tiene evidencias científicas de su acción antiinflamatoria y antioxidante solo de la corteza; no obstante la composición química de la hoja es similar. Por otro lado se hace necesario comparar las dos especies de uncarias respecto a sus bondades biomédicas. Como hipótesis se planteó lo siguiente: Si el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* secuestran radicales libres in vitro, entonces tienen acción antioxidativa. Se plantea como objetivo lo siguiente: Determinar que los extractos acuosos de la hoja de Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) poseen bondades antioxidativas.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades de la uña de gato

2.1.1 Habitat

La uña de gato se desarrolla óptimamente en el bosque primario desde 150 hasta 800 m.s.n.m., así como en el bosque secundario donde se ramifica más densamente, también se encuentra a lo largo de trochas y carreteras. En América se distribuye en Bolivia, Colombia, Brasil, Guyanas, Trinidad y América Central. En el Perú está distribuido en los valles de los ríos Perené y Paucartambo, en Pucallpa, Iquitos, Satipo, La Merced, el Alto Urubamba y en Madre de Dios (SHUNKE, 1993).

2.1.2 *Uncaria tomentosa*

a. Características Botánicas

Es un arbusto, trepador, presente en bosques secundarios que sube a los árboles aledaños a su nacimiento, esta especie de la Familia Rubiaceae y del género *Uncaria* crece formando enredaderas frecuentes en el espesor de la Selva. QUEVEDO (1995), menciona sinónimos como *Nauclea oculeata* H.B.K, *Nauclea tomentosa* Willdenow ex Roemer & Sschultes, *Ouroparia tomentosa* (Willdenow ex Roemer & Shultes). Esta planta llega a medir hasta 20 metros de altura aproximadamente, posee tallos de forma

cuadrangular, cerca del ápice con espinas ganchudas, macizas, proximal dirigidas hacia abajo, no retorcidas. Las hojas tienen un corto pecíolo hasta 1,5 cm. de largo, el limbo es de consistencia membranosa, de forma oblonga aovado de aproximadamente entre 9 a 17 cm. de longitud por 4,3 a 9,0 cm. de ancho agudo, a veces redondeado en el ápice, de color verde amarillento, opaco en el haz y verde pálido en el envés. (OBREGON, 1994).

2.1.3 *Uncaria guianensis*

a. Características Botánicas

Es un arbusto trepador o rastrero de la familia Rubiaceae, del género *Uncaria*, que puede llegar a 30 metros de longitud, con un diámetro en sus tallos (plantas adultas) de 10 a 30 cm. que presenta espinas recurvadas en forma de "cuernos de carnero"; sus hojas posee un corto pecíolo, el limbo oscila entre 6 a 12 cm. de longitud, de forma aovada o elíptica, presenta consistencia coriácea y un color verde oscuro brillante en el haz, el envés es glabro. OBREGÓN (1994), con sinónimos como *Ouparia guianensis* (Aublet) (QUEVEDO, 1995).

2.1.4 Etnomedicina

En el Perú no existen estudios estadísticos etnomédicos acerca del uso diferenciado de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*, en los cuales se constata para cada especie su manejo tradicional en el tratamiento de determinadas patologías. Las dos especies del género *Uncaria* son conocidas como el nombre popular de "Uña de gato", ambas son catalogadas

como plantas "cálidas" dentro del concepto térmico "frío-calor", observado en la Medicina Tradicional Peruana (OBREGON, 1994).

Dentro de las patologías tratadas con las plantas denominadas Uña de gato, con las características botánicas de *Uncaria tomentosa* y/o *Uncaria guianensis*, en la Medicina Tradicional Peruana se hallan:

- Procesos inflamatorios de diversa índole que produzcan esta signología y/o sintomatología en órganos y/o sistemas: artritis (indistintamente sin ninguna clasificación), gastritis (de diferentes etiologías), inflamaciones dérmicas y en vías genitourinarias, asma, etc.
- Úlcera gástrica
- Diabetes
- Enfermedades degenerativas: cáncer (entre ellos del tracto genital femenino, broncopulmonar, gástrico), diversas tumoraciones.
- Procesos virales.
- Irregularidades del ciclo menstrual.
- Convalecencia y "debilidad general".
- Gonorrea: étnia Bora peruana, (OBREGON, 1994).

2.1.5 Composición química

WAGNER *et al.* (1985), reportaron el aislamiento de seis alcaloides oxindólicos pentacíclicos, isopteropodina, pteropodina, mitrafilina, isomitrafilina, rinchofilina, e isorinchofilina.

AQUINO *et al.* (1990), caracterizaron y aislaron un nuevo glicósido del ácido quinóvico, siendo este uno de los principales responsables de la actividad antiinflamatoria. Un nuevo triterpenoide, un glicósido que ya había sido aislado por ellos de *Uncaria guianensis*. YEPEZ *et al.*, (1991). El alcaloide 5-carboxistrictosidina, el ácido oleanólico y el ácido ursólico también fueron aislados por primera vez de *Uncaria tomentosa* por estos autores. CERRI *et al.*, (1988) y, AQUINO *et al.*, (1989) aislaron seis glicósidos del ácido quinóvico.

Se han encontrado en las diferentes partes de la planta distintos componentes; en la raíz, alcaloides (angustina), flavonoides (epicatequina), taninos (catequínicos); en las hojas, alcaloides (rincofilina), flavonoides (kaemferol) y taninos; en la corteza, alcaloides (angustina, rincofilina), flavonoides (kaemferol), glicósidos del ácido quinóvico; y en las flores, el alcaloide angustina; según lo indica KEPLINGER (1998). En 1974 y 1975 al examinarse hojas y brotes de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* por cromatografía de capa delgada se observó que ambas especies presentaban alcaloides semejantes. (OBREGON, 1994).

2.1.6 Propiedades farmacológicas

Los trabajos farmacológicos mencionan que esta planta tiene actividad contraceptiva en altas concentraciones y actividad citostática y antiinflamatoria en cantidades menores (KEPLINGER, 1989).

AQUINO *et al.* (1989), determinaron en pruebas biológicas "in vitro", utilizando dos virus, el VSV de la estomatitis vesicular y un rinovirus 1B (HRV1B) encontrándose un efecto inhibitor sobre el VSV por efecto de los glicósidos de ácido quinóico de *Uncaria tomentosa*. Las investigaciones referidas a la actividad antiviral en fracciones glicosídicas, todavía no son concluyentes.

El extracto acuoso de la planta aplicado externamente da buenos resultados en el caso de heridas abiertas fisuras y hemorroides IACARINO (1988). Los componentes de la *Uncaria tomentosa* estimulan a las células endoteliales para la regulación de la proliferación de linfocitos según KEPLINGER *et al.*, (1998). SANDOVAL *et al.* (1998), indica que la administración de Uña de gato (100 µg/ml) atenuó significativamente ($P < 0.05$) la fragmentación del DNA o muerte celular por apoptosis inducida por el oxidante peroxinitrito en células epiteliales HT29 y células macrófagos RAW 264.7. La Uña de gato inhibió la expresión genética de la enzima óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS) inducida por el lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS); disminuyó ($P > 0.05$) la formación de nitritos, mortalidad de las células e inhibió la activación del factor de transcripción NF-κB. La uña de gato atenuó notoriamente la enteritis inducida por indometacina demostrado por la reducción de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), disminución del daño morfológico y expresión de la proteína hepática metalotionina.

La uña de gato posee excelentes propiedades antioxidativas para inhibir oxidantes y radicales libres dañinos y biodisponibilidad de componentes para aliviar efectos negativos en procesos de inflamación y estrés oxidativo (SANDOVAL *et al.*, 2000).

2.2 Radicales libres

Los radicales libres son átomos que les falta un electrón en la órbita exterior lo que causa que el átomo lleve una carga eléctrica negativa, dos electrones deben estar presentes para asegurar la estabilidad del átomo. Cuando existe un solo electrón, se vuelve inestable siendo muy reactivo con otros átomos a su alrededor (WILLSON, 1997).

La formación de radicales libres es un proceso que ocurre naturalmente, como ejemplo en la combustión de la glucosa y formación de ATP. Las reacciones de los radicales libres son necesarias para la vida. El cuerpo se diseña para usar a los radicales libres como parte de las defensas del sistema inmunológico indeterminadamente y los elimina cuando no los necesitan. Endógenamente formamos estos oxidantes, como consecuencia de la respiración aeróbica normal, las mitocondrias consumen O_2 , como uno de los pasos secuenciales para producir agua. Los derivados inevitables de este proceso son O_2 , H_2O_2 y OH . Cuando las células fagocíticas destruyen las bacterias o virus que infectan a las células con un estallido de oxidantes, óxido nítrico (NO), O_2 , H_2O_2 y OCl^- se genera inflamación, de estos los más

dañinos, se encuentran los superóxidos y el radical oxidrilo (RADI y FREKMAN, 1996).

Los radicales libres surgen como residuos de procesos respiratorios y accidentes, pero los radicales libres no son siempre nocivos. De hecho muchas de estas células se encargan de nuestras defensas, y eliminan bacterias y virus. Por ello, en órganos y tejidos infectados suele producirse una gran cantidad de radicales libres para destruir los microorganismos invasores, aunque al mismo tiempo dañen las células del propio organismo (FIRBAS, 1997).

El cuerpo necesita oxígeno para convertir la comida en energía (proceso de oxidación). Las infecciones y las inflamaciones, son también fuente de radicales libres. En ambos casos, el cuerpo activa gran cantidad de glóbulos blancos, que utilizan radicales libres para destruir bacterias, parásitos y virus que infectan las células. Nuevamente, los radicales libres rebasan a éstas células, y lo que es peor, pueden volverse en contra del sistema inmunológico e incrementar la posibilidad de contraer nuevas infecciones. El ataque de los radicales libres, que se produce en las moléculas, a las células, mientras se infiltran a través de las membranas celulares para reaccionar, crea el estrago con los ácidos nucleicos, proteínas, y enzimas. Estos ataques por los radicales libres, colectivamente conocido como estrés oxidativo, es capaz de causar alteraciones en las células para

perder su estructura, su función y puede en el futuro destruirlas (FIRBAS, 1997).

El efecto de daño del radical libre no sucede inmediatamente. Pero a menos que usted toma los pasos necesarios para ayudar a neutralizar el ataque tenaz de los radicales libres, usted ejecuta el riesgo de permitir el daño acumulativo a los tejidos importantes de su sistema nervioso, conjuntivo, órganos interiores, y los vasos sanguíneos (MACK, 1996).

Las reacciones de los radicales libres son necesarias a la vida. El traslado de electrones es básico a la producción de energía y muchos procesos metabólicos. Sin embargo, si la reacción de la cadena sigue de una manera desenfrenada, el daño a la membrana celular puede ocurrir, produciendo una alteración de la función celular e incluso la muerte celular. Los sistemas de antioxidantes no son infalibles (BASAGA, 1989).

2.3 Estrés oxidativo

Los oxidantes derivados por el metabolismo normal causan daño que se hace extensivo al ADN, proteína y lípidos. El estrés oxidativo se define como el incremento de generación de especies oxigenadas reactivas (EOR), e infieren que el término es sinónimo de daño (HALLIWELL, 1987 y SIES, 1991).

Estrés oxidativo es la disturbación del balance de componentes prooxidantes y oxidantes, que ocurre en el ambiente intracelular como el extracelular, en favor de los prooxidantes; como efecto de este desbalance se genera un potencial daño al tejido (SANDOVAL *et al.*, 1999).

La importancia del efecto negativo del estrés oxidativo en la patofisiología de varias enfermedades tanto en humanos como en animales domésticos está recibiendo gran atención por afectar la salud y performance productiva KEHRER and SMITH (1994) y (HOWARD *et al.*, 1998).

2.4 Mecanismos de las respuestas inmunitarias

Los animales tienen numerosas defensas de antioxidantes, pero estas defensas no son perfectas, por ejemplo el ADN, se oxida. El daño de la oxidación al ADN se repara por enzimas que eliminan las lesiones y es excretada en la orina (AMES, SHIGENAGA; 1993).

Puede considerarse, que los requerimientos básicos del sistema inmunitario incluyen cuatro componentes: Primero, un método de atrapar y procesar el antígeno. Segundo, un mecanismo para reaccionar específicamente frente al antígeno o, en otras palabras, células sensibles al mismo. Tercero, células que produzcan anticuerpos o que participen en la respuesta inmunitaria mediada por células. Cuatro, células que retengan en memoria de lo sucedido y reaccionen de manera específica frente al antígeno en encuentros futuros (TIZARD, 1989).

En un estudio muy general a una de las defensas orgánicas, en contra de enfermedad, se puede observar que hay algo más que la inflamación y la respuesta celular directa. Los granulocitos, agranulocitos, macrófagos, monocitos y linfocitos, pertenecen a la "fuerza policiaca" celular que mantiene libre al cuerpo de material extraño y organismos invasores, pero no realizan su trabajo de defensa, llamada mecanismo inmune, que se compone de anticuerpos, complementos y otras sustancias de defensa (BONE, 1983).

Las células fagocíticas destruyen las bacterias o virus que infectan a las células con un estallido del oxidante, óxido nítrico (NO), O_2 , H_2O_2 , y OCl^- . La infección crónica por virus, bacterias, o parásitos en una actividad de fagocitosis y la inflamación crónica consecuente son un factor de riesgo mayor para el cáncer. Las infecciones crónicas son particularmente prevalentes en los países del tercer mundo (RADI y FREKMAN, 1996).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar y fecha de realización del trabajo

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Nutrición Animal - Espectrofotometría, de la Facultad de Zootecnia, de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), de la ciudad de Tingo María, distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huanuco.

Tingo María, geográficamente se encuentra ubicada a 09°10'07" de latitud sur, 75°53'00" de longitud oeste, a una altitud de 660 m.s.n.m. Humedad relativa promedio de 84 %, temperatura media anual de 24.4 °C y una precipitación pluvial de 3 285 mm.

El estudio se inició con una etapa pre - experimental comprendida en los meses de enero a marzo, y la experimental entre los meses de abril a octubre del 2000.

3.2 Materia prima

Se utilizó las hojas tiernas de *Uncaria tomentosa* procedente del vivero forestal y *Uncaria guianensis* procedente del bosque reservado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

3.3 Materiales y equipos

1. Productos químicos

Todos los químicos fueron de grado reactivo y obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2. Equipos y materiales

Se utilizaron los siguientes:

- Balanza analítica: Marca Ohaus, Modelo N° AP210-0, Capacidad 210g x 0.1mg.
- Espectrofotómetro de luz: Marca Shimatzu, Modelo UV/V – 1201, Longitud de onda de 200 a 1100 nm.
- Centrifuga: Marca International Equipment Co, Modelo IEC, Clinical Centrifuge
- Refrigeradora: Marca Admiral.
- Baño maría: Marca Precision GCA Corporation, Modelo N° 188.
- Estufa: Marca Thelco, Modelo N° 17.
- Desionizador de agua: Marca Easy pure RF, Modelo D7031.
- Destilador de agua: Marca Sybron/Branstead, Serie N° 85-05-124.
- Cocina de plataforma: Marca Barnstead/Thermoline, Modelo N° HP47130.
- Stirret: Marca Sargent & CO, Serie N° 192060.
- Micropipetas: Marca Boeco, Modelo Boeco pipette 5 – 50 μ l, 50 – 200 μ l y 200 – 1000 μ l.
- Gradillas, tubos, microtubos, pipetas, bakers, fiolas, termómetros, watman paper # 42, cocina eléctrica, guantes, etc.

3.4 Tratamientos en estudio

3.4.1 Variables independientes

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en la inhibición del DPPH

Tratamientos	Extracto acuoso de hoja fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	Extracto acuoso de hoja fresca de <i>Uncaria guianensis</i>
T1, control	0 µg/ml	0 µg/ml
T2	10 µg/ml	10 µg/ml
T3	100 µg/ml	100 µg/ml
T4	300 µg/ml	300 µg/ml
T5	1000 µg/ml	1000 µg/ml

Cuadro 2. Tratamientos utilizados en la degradación del peroxinitrito

Tratamientos	Extracto acuoso de hoja fresca de <i>Uncaria tomentosa</i>	Extracto acuoso de hoja fresca de <i>Uncaria guianensis</i>
T1, control	0 µg/ml	0 µg/ml
T2	100 µg/ml	100 µg/ml
T3	500 µg/ml	500 µg/ml
T4	1000 µg/ml	1000 µg/ml

3.5 Parámetros evaluados

3.5.1 Variable dependiente

- Inhibición del radical libre; 1,1 α - diphenil, β - picryhidrazyl (DPPH)
- Inhibición del oxidante, peroxinitrito (PN)

3.6 Metodología de trabajo

3.6.1 Obtención del extracto acuoso de hoja de uña de gato.

El extracto de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* se preparó de hojas tiernas de la uña de gato. Se hierve 100 g de hojas tiernas de uña de gato en agua enrazado a 1000 ml por 10 minutos. Dejar en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se filtró en papel watman # 42. Este extracto se considera como 100 mg/ml; luego se almacena a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 1.5 ml. Similar procedimiento se realizó para cada especie de *Uncaria*. A partir de esta solución se preparó las diferentes concentraciones para los experimentos (0, 10, 100, 300, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$).

3.6.2 Síntesis de oxidantes de peroxinitrito

Brevemente el proceso de síntesis de peroxinitrito (PN) consiste en hacer reaccionar la solución (A) 0.7 M NaNO_2 , 0.7 M H_2O_2 con la solución (B) 0.6 M HCl. Ambas soluciones A y B, se bombeó usando una bomba de infusión con jeringa (Harvard Apparatus, South Natick, MA) a 25 ml/min, hacia una unión Y-junction y mezclada en un tubo de sílice de 2 mm de diámetro por 0.5 cm de longitud. La mezcla se colectó en un beaker conteniendo KOH, 1.5 M. Para destruir el exceso de H_2O_2 en la solución stock de peroxinitrito se filtra en una columna conteniendo MnO_2 (4 g). La concentración de PN en la solución stock se determinó espectrofotométricamente a 302 nm ($E_{302} = 1670/\text{m/cm}$). Las alícuotas se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada experimento se preparó una solución de peroxinitrito (PN, 5 mM y filtrado a 0.2 μm).

3.6.3 Actividad antioxidativa

3.6.3.1 Inhibición de radicales libres, DPPH

La capacidad de inhibir radicales libres en extracto acuoso de hoja de uña de gato se determinó in vitro mediante el método de secuestro del radical libre 1,1 α -diphenil, β -picrylhidrazyl (DPPH), conforme se describe. Muestras de los extractos acuosos de uña de gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) (50 μ l) reacciona con una solución metanólica de DPPH (100 μ M), volumen final 1 ml. La absorbancia se registró cada minuto en el espectrofotómetro Shimatzu UV-1200 a 515 nm. La absorbancia de la solución standard de DPPH (100 μ M) se leyó por 15 minutos con el fin de evaluar su estabilidad.

3.6.3.2 Inhibición de peroxinitrito

Para los estudios de la actividad antioxidativa del extracto acuoso de hojas de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* se utilizó el oxidante, peroxinitrito.

Muestras diluidas de la solución stock del peroxinitrito (40 mM) fueron usadas para preparar soluciones de 1 mM de peroxinitrito que contenían 5 mM KOH (ph 12). El volumen final fue de 1 ml y la absorción a 302 nm. Se usó el espectrofotómetro *Shimatzu* para confirmar el cambio en absorción. En experimentos separados, la absorción de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* diluida en 5 mM de KOH o reaccionado con 1 mM de peroxinitrito.

3.7 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó mínimo tres veces y los resultados son representados por el promedio \pm S.E.M. Los análisis estadísticos se condujo bajo un Diseño Completamente al Azar (D.C.A.); también se realizó pruebas de comparación de medias y análisis de varianza de la regresión en la determinación de la inhibición del radical libre DPPH y Peroxinitrito. También se utilizó la prueba T.

El modelo matemático del D.C.A. es:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Observación cualesquiera (j-ésima al cual se aplicó el i-ésimo tratamiento).

μ : Efecto de la media general.

T_i : Efecto del i-ésimo tratamiento ($i = 6$)

E_{ij} : Efecto aleatorio del error experimental.

i : 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

j : 1, 2 y 3.

IV. RESULTADOS

4.1 Actividad antioxidativa

La capacidad antioxidativa del extracto acuoso de la hoja de uña de gato fue evaluada utilizando 2 modelos de acción in vitro: 1) acción de inhibir o secuestrar DPPH, y 2) acción contra el oxidante nocivo peroxinitrito que es producido en condiciones fisiológicas en estado de inflamación.

4.1.1 Inhibición del radical libre, DPPH

a. Extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa* (EAHFUt), al reaccionar con el radical libre 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH), muestra que existe diferencia estadística entre tratamientos ($P \leq 0.001$). En el cuadro 3 se puede observar que la capacidad de inhibición está de acuerdo a la concentración del extracto acuoso, siendo el T5 (1000 $\mu\text{g/ml}$) el que posee mayor capacidad de inhibición del radical libre.

Cuadro 3. Efecto del extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa* en la inhibición del DPPH¹.

Tratamientos (concentración de EAHFUt)	Absorbancia 515 nm	Inhibición %
T1 : 0 µg/ml	0.867 ± 0.004	ND ²
T2 : 10 µg/ml	0.691 ± 0.003	20.30 ± 0.306 ^c
T3 : 100 µg/ml	0.291 ± 0.028	66.40 ± 3.235 ^b
T4 : 300 µg/ml	0.103 ± 0.011	88.12 ± 1.300 ^a
T5 : 1000 µg/ml	0.078 ± 0.003	90.79 ± 0.214 ^a

¹ Valores representan promedio ± SEM y provienen de n = 3. Lecturas de absorbancias obtenidas en 15 minutos. Valores en una misma columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (P ≤ 0,001). ² Representa la absorbancia del DPPH (100µM) como control sin reaccionar con EAHFUt.

En el gráfico 1 se observa que en los 4 primeros minutos se da la mayor inhibición del radical libre siendo el de 1000 µg/ml el de mayor velocidad de secuestro.

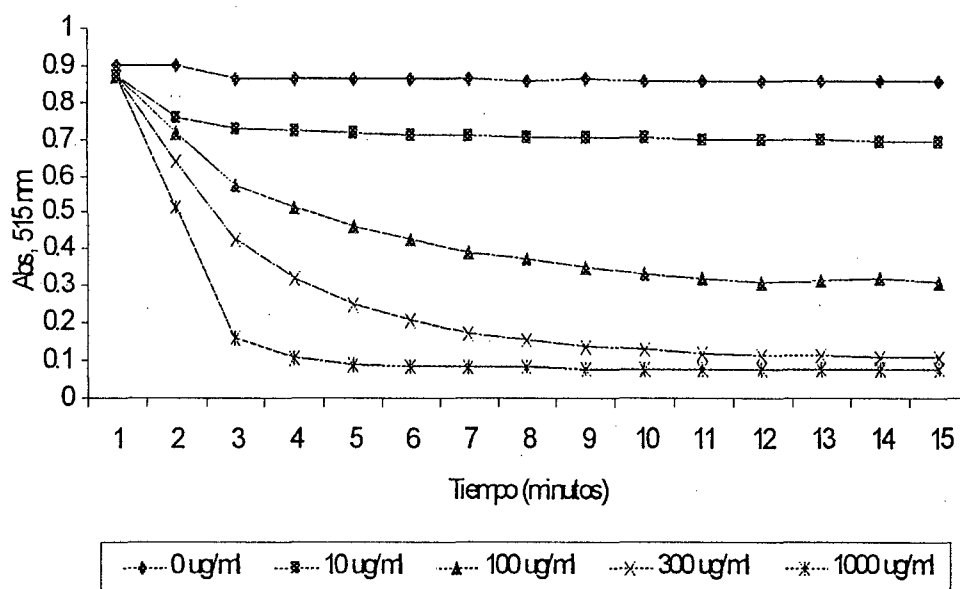


Gráfico 1. Curvas de degradación del DPPH por acción del extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa*

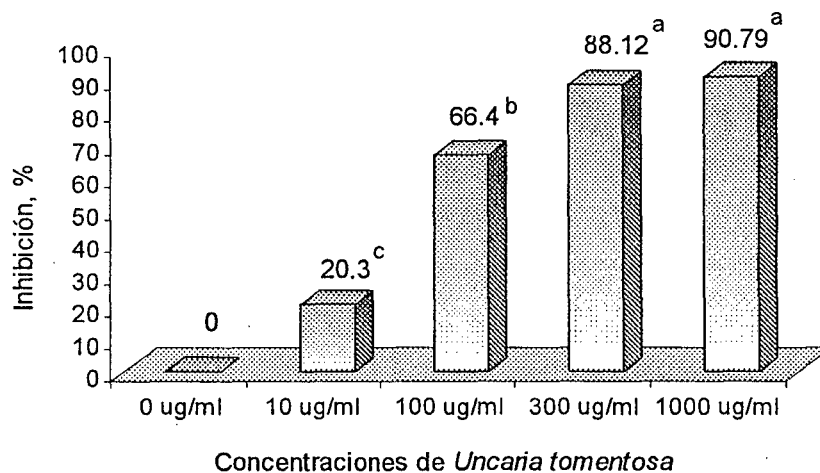


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH con extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa*

El gráfico 3, muestra el coeficiente de inhibición (IC_{50}) de DPPH. Se observa una correlación positiva ($r=0.9713$), y en base a esta ecuación se determinó que la concentración de EAHFUt requerida para inhibir el 50 % de DPPH es de $47.741 \mu\text{g/ml}$.

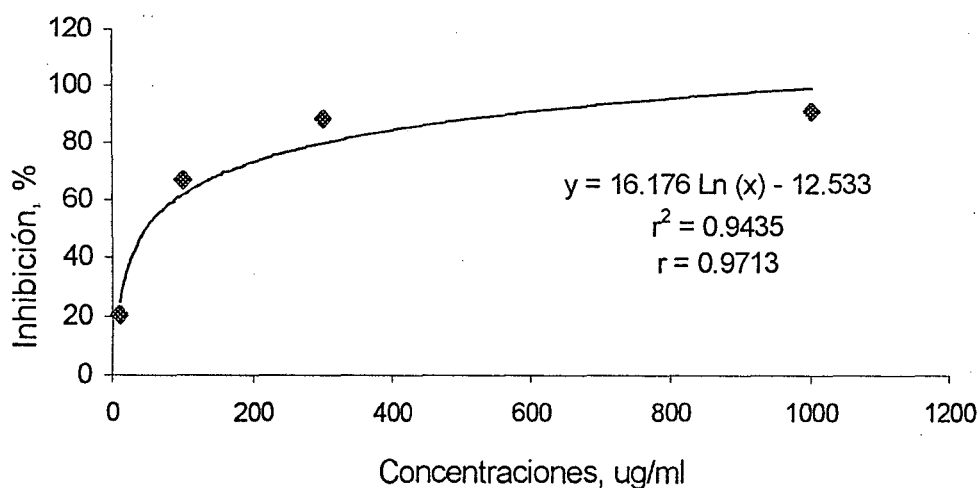


Gráfico 3. Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del DPPH por el extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa*

b. **Extracto Acuoso de Hoja Fresca de *Uncaria guianensis* (EAHFUg)**, al reaccionar con el radical libre 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH), muestra que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos ($P \leq 0.001$). En el cuadro 4 se puede observar que la capacidad de inhibición está de acuerdo a la concentración del extracto acuoso, el T5 (1000 $\mu\text{g/ml}$) que posee mayor capacidad de inhibición del radical libre.

Cuadro 4. Efecto del extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria guianensis* en la inhibición del DPPH¹.

Tratamientos (concentración de extracto acuoso)	Absorbancia 515 nm	Inhibición %
T1 : 0 $\mu\text{g/ml}$	0.867 \pm 0.004	ND ²
T2 : 10 $\mu\text{g/ml}$	0.623 \pm 0.032	28.11 \pm 3.729 ^c
T3 : 100 $\mu\text{g/ml}$	0.330 \pm 0.025	61.90 \pm 2.911 ^b
T4 : 300 $\mu\text{g/ml}$	0.140 \pm 0.003	83.89 \pm 0.364 ^a
T5 : 1000 $\mu\text{g/ml}$	0.071 \pm 0.002	91.77 \pm 0.235 ^a

¹ Valores representan promedio \pm SEM y provienen de $n = 3$. Lecturas de absorbancias obtenidas en 15 minutos. Valores en una misma columna con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,001$). ² Representa la absorbancia del DPPH (100 μM) como control sin reaccionar con EAHFUg.

En el gráfico 4 se observa que en los primeros 4 minutos ocurre una degradación del radical DPPH en una forma más drástica. Se notó que a medida que se incrementó la concentración de EAHFUg, su capacidad de inhibir el radical libre se mejoró considerablemente.

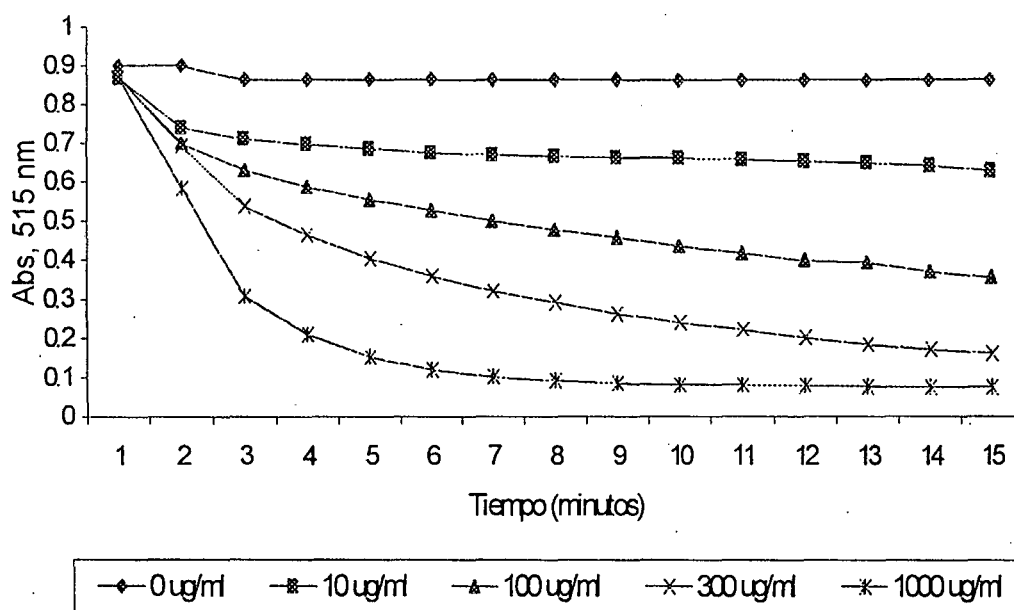


Gráfico 4. Curva de degradación del DPPH por acción del extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria guianensis*

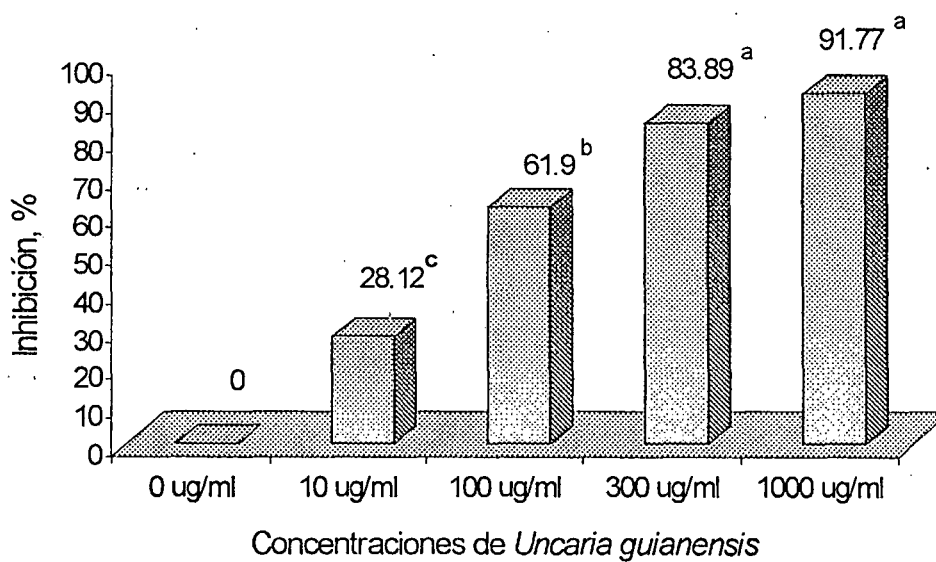


Gráfico 5. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH con extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria guianensis*

El gráfico 6, muestra el coeficiente de inhibición (IC_{50}) de DPPH. Se observa una correlación positiva ($r=0.9901$), y en base a esta ecuación se determinó que la concentración de EAHFUg requerida para inhibir el 50 % de DPPH es de 42,085 $\mu\text{g/ml}$.

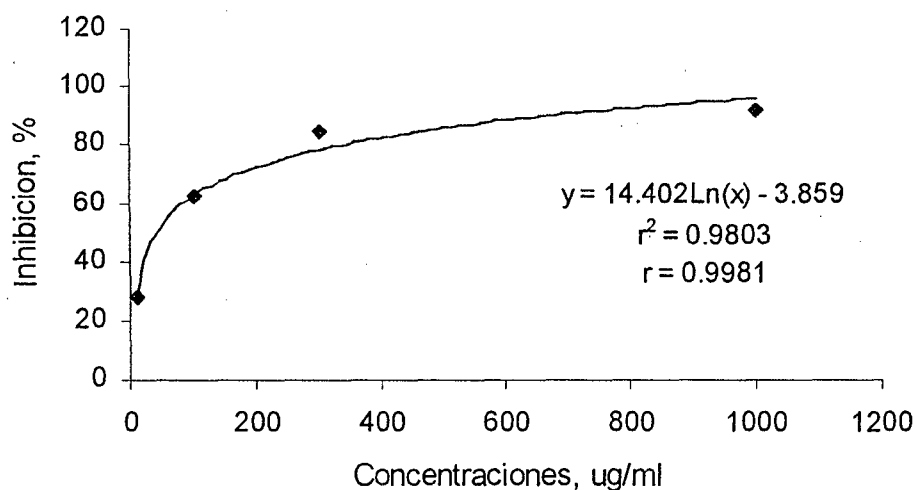


Gráfico 6. Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del DPPH por el extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria guianensis*

c. El cuadro 5, muestra las comparaciones entre el Extracto Acuoso de Hoja Fresca de las especies de Uña de gato evaluadas (EAHFUt versus EAHFUg) en su capacidad de inhibir el radical libre 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazil (DPPH). Se observó que no existe diferencia estadística significativa entre ambas especies en las concentraciones de 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$. Por otro lado, se detectó una ligera diferencia ($P \leq 0.05$) solamente en 300 $\mu\text{g/ml}$ (Gráfico 7).

Cuadro 5. Comparativo de la actividad inhibitoria del DPPH entre los extractos acuosos de hoja fresca de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*¹

μg/ml	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Uncaria guianensis</i>
	Porcentaje de inhibición, %	
10	20.07 ± 0.202 ^a	28.07 ± 0.905 ^a
100	66.40 ± 3.235 ^a	61.90 ± 2.911 ^a
300	88.12 ± 1.300 ^a	83.89 ± 0.364 ^b
1000	90.69 ± 0.242 ^a	91.77 ± 0.235 ^a

¹ Valores representan promedio ± SEM y provienen de n=3. Lecturas de absorbancias obtenidas en 15 minutos. Valores en una misma fila que poseen diferentes superíndices son estadísticamente diferentes (P ≤ 0.001)

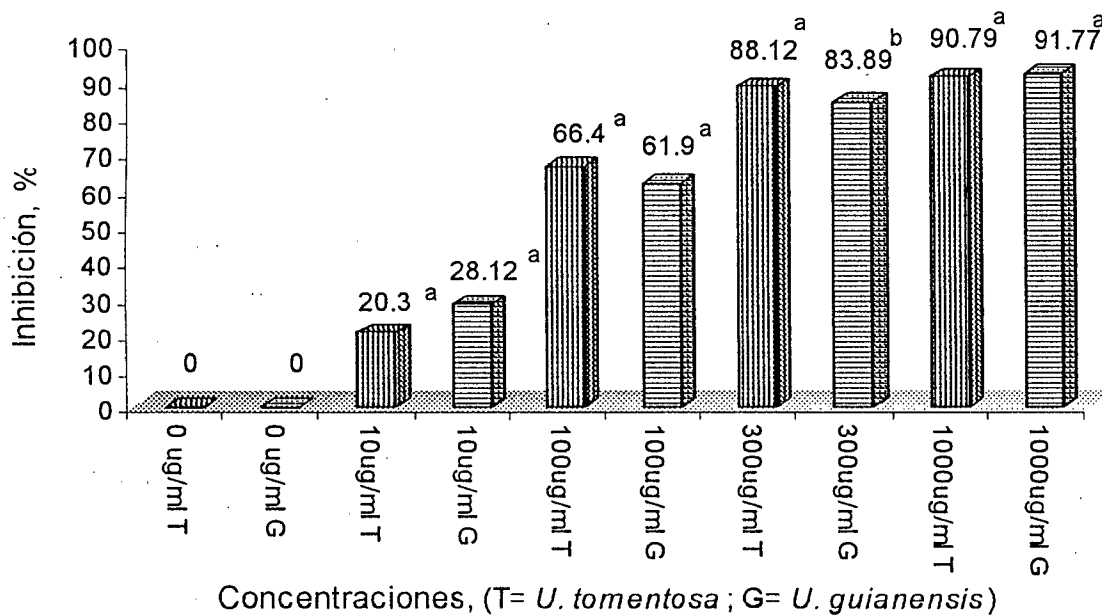


Gráfico 7. Comparativo de la actividad antioxidativa de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*

4.1.2 Inhibición del oxidante peroxinitrito

a. **Extracto Acuoso de Hoja Fresca de *Uncaria tomentosa* (EAHFUt)**, al reaccionar con el oxidante Peroxinitrito (PN), se demuestra que existe diferencia estadística ($P \leq 0.001$), entre los tratamientos. En el gráfico 8 se observa que la mayor capacidad de inhibición de PN se obtuvo a la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de EAHFUt.

Cuadro 6. Inhibición del oxidante peroxinitrito por efecto del extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa*¹.

Tratamientos (concentración de EAHFUt)	Inhibición %
T1 : 0 $\mu\text{g/ml}$	ND
T2 : 100 $\mu\text{g/ml}$	25.40 \pm 1.756 ^c
T3 : 500 $\mu\text{g/ml}$	35.51 \pm 1.244 ^b
T4 : 1000 $\mu\text{g/ml}$	61.36 \pm 0.973 ^a

¹ Valores representan promedio \pm SEM y provienen de $n=3$. Valores en una misma columna con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,001$).

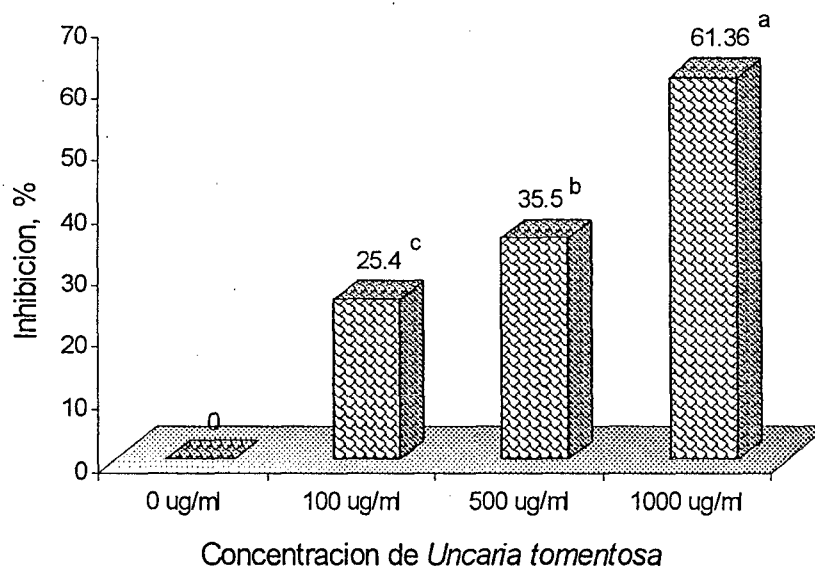


Gráfico 8. Porcentaje de inhibición del oxidante PN con extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa*

El porcentaje de inhibición del peroxinitrito presenta un coeficiente de correlación positivo ($r=0.9832$), explicando el grado de asociación que existe entre el nivel de concentración del EAHFUt. El coeficiente de inhibición del 50 % de PN (IC_{50}) fue obtenida a una concentración de 774.1 $\mu\text{g/ml}$ de EAHFUt.

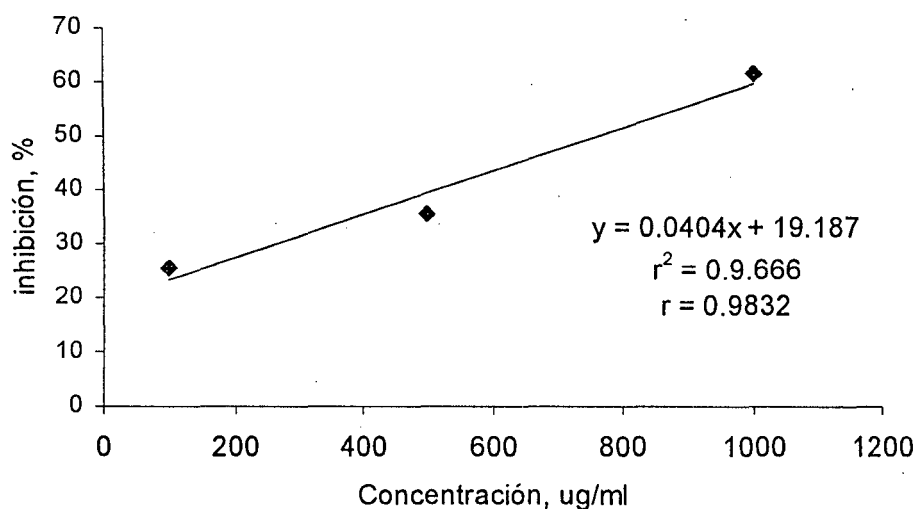


Gráfico 9. Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del oxidante peroxinitrito por el extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria tomentosa*

b. Extracto Acuoso de Hoja Fresca de *Uncaria guianensis* (EAHFUg), al reaccionar con el oxidante peroxinitrito (PN), se demuestra que existe diferencia estadística ($P \leq 0.001$), entre los tratamientos. En el gráfico 12 se observa que la mayor capacidad de inhibición de PN se obtuvo a la concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de EAHFUg.

Cuadro 7. Inhibición del oxidante peroxinitrito por efecto del extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria guianensis*.¹

Tratamientos (concentración de EAHFUt)	Inhibición %
T1 : 0 $\mu\text{g/ml}$	ND
T2 : 100 $\mu\text{g/ml}$	24.47 \pm 1.195 ^c
T3 : 500 $\mu\text{g/ml}$	52.75 \pm 1.681 ^b
T4 : 1000 $\mu\text{g/ml}$	94.91 \pm 2.371 ^a

¹ Valores representan promedio \pm SEM y provienen de n=3. Valores en una misma columna con diferente superíndice son diferentes estadísticamente ($P \leq 0.001$)

En el gráfico 11 se aprecia que la degradación del oxidante peroxinitrito se da en los primeros segundos de hacer reaccionar PN con el extracto acuosos de hoja de *Uncaria guianensis*, siendo mas efectiva la mayor concentración (1000 $\mu\text{g/ml}$) continuando con tendencia a ser constante en todos los tratamientos.

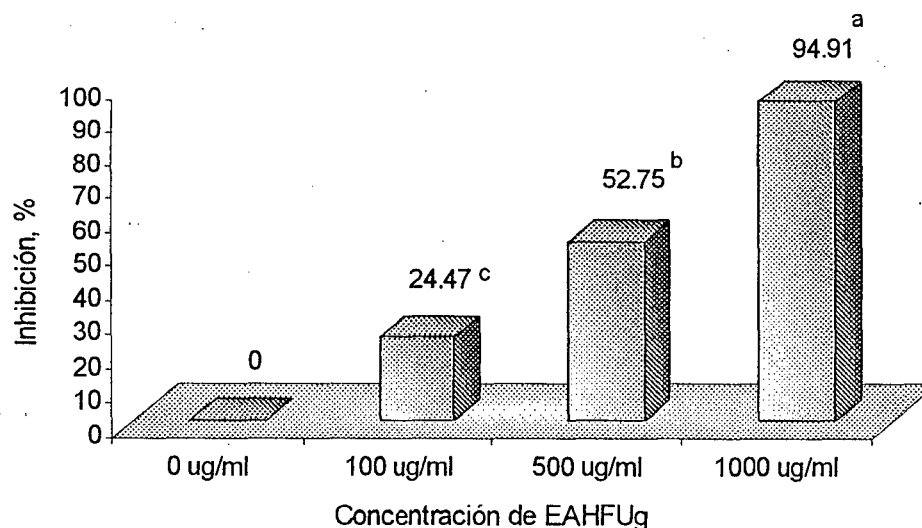


Gráfico 10. Porcentaje de inhibición del oxidante peroxinitrito con el extracto acuoso de hoja fresca de *Uncaria guianensis*

El porcentaje de inhibición del Peroxinitrito presenta un coeficiente de correlación positivo ($r=0.9988$), explicando el grado de asociación que existe entre el nivel de concentración del EAHFUg. El coeficiente de inhibición del 50 % de PN (IC_{50}) fue obtenida a una concentración de 396.2 $\mu\text{g/ml}$ de EAHFUg. (Gráfico 11)

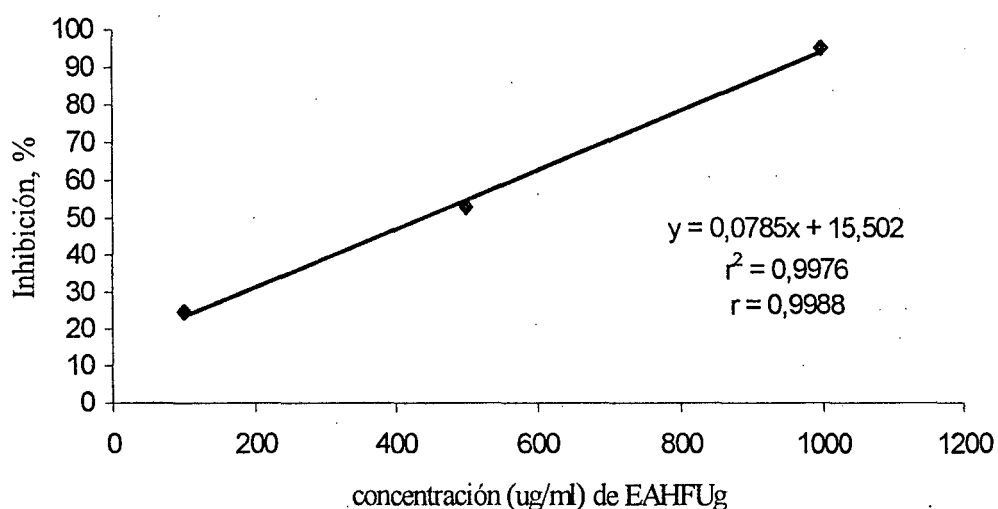


Gráfico 11. Coeficiente de inhibición (IC_{50}) del oxidante Peroxinitrito por el EAHFUg

c. Al hacer comparaciones del extracto acuoso de hoja fresca de ambas especies (EAHFUt vs EAHFUg) en su capacidad de degradar al oxidante Peroxinitrito el cuadro 8, muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos T1 de ambas especies ($P \leq 0.05$) pero si se encuentra significancia en el T2 y T3 ($P \leq 0.0001$) como se observa en el gráfico 14.

Cuadro 8. Comparativo de la actividad inhibitoria del peroxinitrito entre los extractos acuosos de hoja fresca de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*¹

μg/ml	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Uncaria guianensis</i>
	Porcentaje de inhibición, %	
100	25.40 ± 1.378 ^a	24.47 ± 1.195 ^a
500	35.51 ± 1.244 ^b	52.75 ± 1.681 ^a
1000	61.36 ± 0.973 ^b	94.91 ± 2.371 ^a

¹Valores representan promedio ± SEM y provienen de n=3. Valores en una misma fila con diferente superíndice son estadísticamente diferentes (P<0,001)

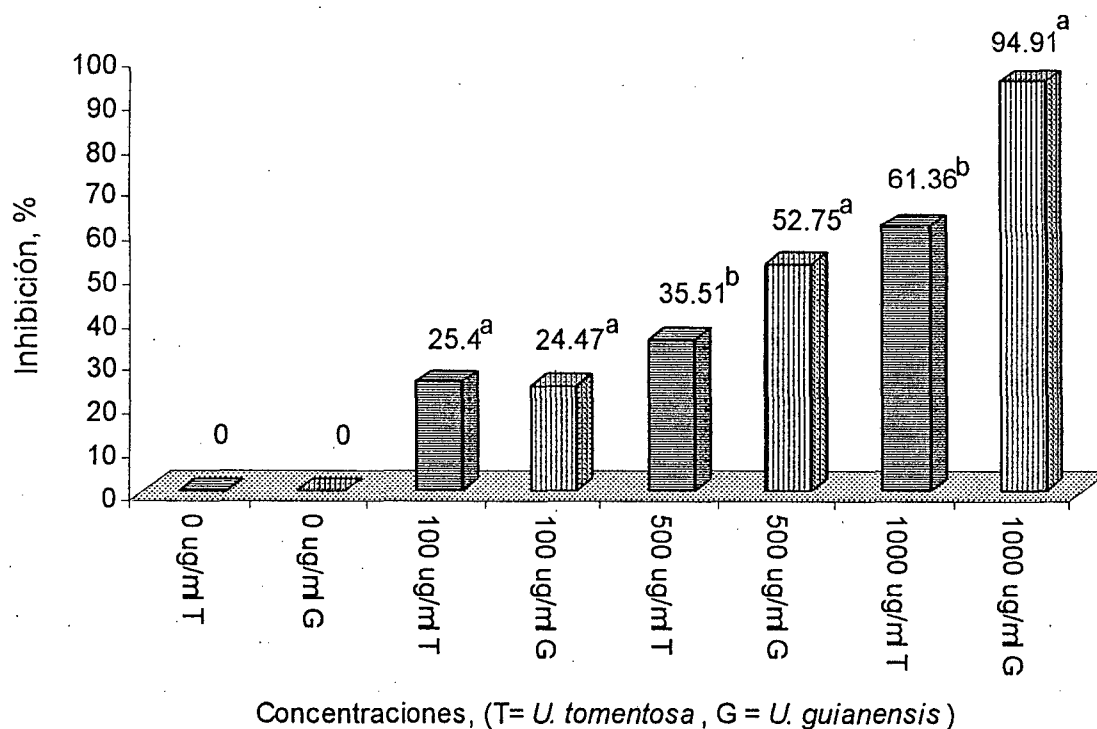


Gráfico 12. Comparativo de la actividad inhibitoria de la *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*

4.2 Determinación de ácido ascórbico, Vitamina C

La determinación de vitamina C se realizó mediante el método 2,4- Dinitrophenylhydrazine, se observa que existen diferencias significativas como se muestra en el cuadro 9.

Cuadro 9. Contenido de Vitamina C en extractos acuosos de hoja de uña de gato¹

<i>Uncaria sp.</i>	mg/l
<i>U. tomentosa</i>	0.616 ± 0.040 ^a
<i>U. guianensis</i>	0.260 ± 0.020 ^b

¹Valores representan promedio ± SEM y provienen de n=3. Concentración de ácido ascórbico a partir de la solución conteniendo 1000 µg de UkG/ml. Valores en una misma columna que poseen diferentes superíndices son estadísticamente significantes (P ≤ 0,001).

V. DISCUSIÓN

5.1 Inhibición del radical libre, DPPH

Se utilizó el método de secuestro o inhibición del radical libre, DPPH; por estar reconocido para la determinación de la capacidad de antioxidativa de productos en su propiedad de inhibir radicales libres. Los resultados de los experimentos químicos demostraron que el extracto de hoja de uña de gato posee propiedades antioxidativas que se sustenta en la capacidad inhibitoria o secuestro del radical libre 1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl (DPPH). Para ambas especies (*Uncaria tomentosa*, *Uncaria guianensis*) el tratamiento con 1000 µg/ml generó la mayor capacidad de inhibición de DPPH, de 90.79 y 91.77 % respectivamente. El coeficiente de inhibición al 50 % de DPPH (IC₅₀) fue de 47.741 y 42.085 µg/ml de hoja fresca de uña de gato para ambas especies, respectivamente. En trabajos realizados con *Uncaria tomentosa*, corteza liofilizada y micropulverizada se han reportado resultados de IC₅₀ de 30 y 150 µg/ml, para ambas formas de procesamiento de la uña de gato; SANDOVAL (1998). Nuestros resultados indican que la hoja posee también una alta capacidad de inhibición o secuestro de radicales libres. Estos resultados, nos permite indicar que un extracto acuoso de hoja de uña de gato y luego sometido a un proceso de liofilización, proveerá una

mejor eficacia de controlar o eliminar radicales libres que un producto micropulverizado o liofilizado de corteza de uña de gato.

Por lo tanto la hoja de uña de gato ha demostrado tener capacidad de inhibir radicales libres que están involucrados en el proceso de envejecimiento y falta de función de las células como lo menciona KARP (1998).

5.2 Inhibición del oxidante Peroxinitrito

Conociéndose que en los procesos intensivos de producción animal ocurre un desbalance entre los oxidantes y antioxidantes, que en consecuencia afectan la salud celular; se evaluó la capacidad de los extractos de hoja de uña de gato para aminorar el efecto negativo del oxidante, peroxinitrito que se produce normalmente en el organismo como parte de un proceso de inflamación. Se encontró que los extractos acuosos de la hoja de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* respondieron con una capacidad de degradación de 61.36 y 94.91 % respectivamente. El coeficiente de inhibición al 50 % (IC₅₀), determinado a los 120 segundos se consigue con 774.1 y 396.2 µg/ml de hoja de uña de gato de ambas especies respectivamente. (SANDOVAL, 2000).

En base a nuestros resultados reportados, las propiedades antioxidativas de la hoja de uña de gato no difieren de manera significativa en ambas especies lo cual puede deberse a la similitud de componentes químicos que estas poseen, como alcaloides, flavonoides, entre otros.

OBREGON (1994), aunque la *Uncaria tomentosa* supera en gran cantidad de alcaloides a la *Uncaria guianensis*, SANDOVAL (comunicación personal); su actividad antioxidativa y antiinflamatoria es similar, esto puede explicar que dichas propiedades medicinales no se deben fundamentalmente a la acción de un componente en particular como por ejemplo, alcaloides, sino a la acción sinérgica de un conjunto de componentes químicos como lo menciona SANDOVAL (2000).

La determinación de la concentración de ac. ascórbico se realizó con el fin de tener referencia la proporción de esta en las hojas de cada especie y de qué manera influye en su actividad antioxidativa; se observó que existen diferencias, esto también nos permite suponer que la acción antioxidativa de la planta se debe a respuesta conjunta de compuestos activos presentes en ella. Se tiene referencias de la determinación que la *Uncaria tomentosa* tiene mayor cantidad de alcaloides que la *Uncaria guianensis* y su vez ésta es superior a la *Uncaria tomentosa* en presencia de flavonoides corroborando nuestra hipótesis de una acción sinérgica de todos los componentes químicos que pueda tener la hoja de uña de gato contra los oxidantes y radicales libres. (SANDOVAL, comunicación personal).

Interpretando colectivamente nuestros resultados, podemos indicar que la actividad antioxidativa determinada en los extractos acuosos de la hoja de uña de gato constituyen uno de los mecanismos por las cuales la de uña de gato actúa como antiinflamatorio. Esto explicaría su propiedad

medicinal debido a su capacidad de neutralizar oxidantes y radicales libres mencionado por SANDOVAL (1998). Por lo tanto según lo comenta FIRBAS (1997), la hoja de uña de gato proveería protección celular tanto para animales domésticos como para humanos sobre todo en estados de producción intensiva, inflamación crónica y estrés oxidativo. El mecanismo de protección de la uña de gato, corresponde a la aniquilación de oxidantes y radicales libres que circulan en los líquidos extracelulares; de este modo protege la membrana celular y proteínas, evitando ser modificadas oxidativamente. Así mismo, acción de la uña de gato, ocurre a nivel intracelular protegiendo proteínas, y material genético (ADN), conforme ha sido reportado por otros autores (SANDOVAL *et al.* 2000).

Desde el punto de vista zootécnico, la acción antioxidativa de la hoja de uña de gato contribuiría coadyuvar una buena performance del animal en sistemas de producción intensiva, debido a que en ellos los animales están expuestos a un estrés oxidativo constante (postura de huevos, producción de leche, producción de lana, gestación, etc) (MAYNARD *et al.* 1993).

VI. CONCLUSIONES

- La hoja de uña de gato posee excelentes propiedades para inhibir oxidantes y radicales libres.
- Las hojas de las especies de uña de gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) tienen similar actividad antioxidativa.
- La capacidad de inhibición del 50 % de DPPH por las hojas de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* fue de 47.741 y 42.085 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.
- La capacidad de inhibición del 50 % de peroxinitrito por las hojas de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* fue de 774.1 y 396.2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.
- La acción antioxidativa indica que uno de los mecanismos por las cuales la hoja de la uña de gato funciona como antiinflamatorio, se debe a su capacidad de neutralizar oxidantes y radicales libres.

VII. RECOMENDACIONES

- Utilizar la hoja de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) como preventivo al estrés oxidativo y en inflamaciones crónicas generadas en los seres vivos.
- Incentivar la realización de trabajos de investigación en otros modelos biológicos incluyendo estudios clínicos para la aplicación en la producción pecuaria.
- Investigar formas de procesamiento para facilitar la incorporación del producto a un manejo de producción animal.
- Promover mayores investigaciones biomédicas e industrialización de la hoja de uña de gato.
- Promover investigación con uña de gato que contemple aspectos de su preservación, manejo, y de producción agronómica.

VIII. ABSTRACT

The present study was conducted in the Laboratories of Nutrition and Spectrophotometry, Faculty of Animal Science at Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo Maria, Peru. The experiments were conducted from April to October of 2000. The objective was to determine whether the aqueous extracts of cat's claw leaves (AECCL) from the two species (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) have antioxidative properties. The antioxidative capacity of the AECCL was evaluated using two in vitro methodologies as follows: 1) inhibition of the stable free radical 1,1 α -diphenil- β -picrylhidrazyl (DPPH), and 2) scavenging of the oxidant peroxyxynitrite, which is produced under conditions of inflammation. Both assays were performed using a V/UV Shimadzu 1200 spectrophotometer. The inhibition of DPPH was assessed by reacting different concentrations of AECCL (10 - 1000 μ g/ml) with an ethanolic solution of DPPH (100 μ M). The inhibition of DPPH was quantified by the decrease in absorbance at 515 nm, and the readings were recorded every minute for 15 minutes. The highest concentration of AECCL (1000 μ g/ml) from the two species, decreased DPPH in the order of 90.79 % for *Uncaria tomentosa*, and 91.77 % for *Uncaria guianensis*. The IC₅₀ values were 47.741 μ g/ml and 42.085 μ g/ml for the AECCL of *Uncaria tomentosa* (*Ut*) and *U. guianensis* (*Ug*), respectively. To evaluate the capacity

of the AECCL to scavenge peroxynitrite, variable concentrations of AECCL from the two species were used (100 - 1000 $\mu\text{g/ml}$). Peroxynitrite was synthesized in the laboratory following a previous published methodology. The solutions containing AECCL were reacted with peroxynitrite (1 mM) and the decay of the peroxynitrite absorbance at 302 nm was recorded every 10 seconds for 2 min. Both species of cat's claw (*Ut* and *Ug*) at concentrations of 1000 $\mu\text{g/ml}$ degraded peroxynitrite significantly by 61.36 y 94.91 %, respectively. The IC_{50} values were 774.1 y 396.2 $\mu\text{g/ml}$ for the AECCL of *Ut* and *Ug*, respectively. Based on these results we may conclude that the leaves of cat's claw (*Ut* and *Ug*) have excellent antioxidative properties because of their scavenging capacity to quench free radicals (DPPH), and toxic oxidants such as peroxynitrite. It has been shown that free radicals and peroxynitrite are deleterious to the health of the cell. Hence, both species may be beneficial as sources of natural antioxidant. The results from the present study also indicate that the content of ascorbic acid in the leaves of cat's claw may not be the major bioactive components that contribute to their antioxidant activity because of its low content. On the contrary, it seems that the presence of other phytochemicals such as polyphenols may be the major components that exert the beneficial effects on cell protection against oxidative stress. Collectively our data demonstrate that the leaves of both species of cat's claw *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* contain antioxidant components that could be useful in the amelioration of oxidative stress conditions. Under intensive livestock production the administration of aqueous extracts of cat's claw leaves may contribute to improve animal health

and in turn production. Finally, we recommend to conduct further experiments with animal models to elucidate the protective mechanisms.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMES, B., SHIGENAGA, M., HAGEN, T. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci. 1993. 90:7915-7922. [en línea]: (<http://www.heathnotes.com>, journals, 25 de marzo 2000).
- AQUINO, R., DE SIMONE, F., PIZZA, C., CONTI, C. AND STEIN, M. L. 1989. Plants Metabolites, Structure and in vitro Antiviral Activity of Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guetarda platypoda*. J. of Natural Products. 51 (2).
- AQUINO, R., DE SIMONE, F., VINCIERI, F. F., PIZZA, C. AND GACS-BAITZ, E. 1990. New Polyhydroxylated Triterpenes from *Uncaria tomentosa*. J. of Nat. Prod. 53 (3).
- BASAGA, H. 1989. Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol 68: 989-998.
- BONE, J. 1983. Fisiología y Anatomía Animal. Editorial El Manual Moderno. México. México. 494p.
- CERRI, R., AQUINO, R., DE SIMONE, F. Y PIZZA, C. 1988. New Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria tomentosa* J. Of Nat. Prod. 51 (2).
- FIRBAS, J. 1997. Protéjase de los Radicales Libres. Salud & Deporte. Lima. Peru. 3(13)12-16.

- GARNER, R. 1970. Toxicología Veterinaria. 3era edición. Editorial ACRIBIA. Zaragoza. España. 470p.
- HALLIWELL, B. 1987. Oxidants and human disease: Some new concepts. FASEB J. 1: 358-364.
- HOWARD, D.J., OTA, R.B., BRIGS, L.A., HAMPTON, M. PRITSOS, C.A. 1998. Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 7: 981-988.
- CONGRESO INTERNACIONAL DE MEDICINAS TRADICIONALES (2, 1988, LIMA). 1988. Nuevos Acidos Glicócidos de la *Uncaria tomentosa*. Area Farmacognocia. Lima - Perú.
- KARP, G. 1998; Biología celular y molecular. Mexico, Mexico. Mc Graw-Hill Interamericana; 746 p.
- KEHRER, J.P., and SMITH, C.V. 1994. Free radicals in Biology: Sources, Reactivities, and Roles in the Etiology of Human Diseases. In Natural Antioxidants in Human Health an disease. B. Frei ed. Academic Press, San Diego, California. pp. 25-62.
- KLEPINGER, K. 1989. Oxindole Alkaloids having the Properties Stimulating the Immunologic System. J. of pharmacology. U. S. Patent. #4. U.S.A.
- KLEPINGER, K., LAUS, L., WURM, M., DIERICH, M., TEPPNER, H. 1998. *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC.- Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. J. of Ethnopharmacology. 64 (23) 23-24.

- MACK, A. 1996. Trying to unlock the mysteries of free radicals and antioxidants. 10(19):13 - 16. [en línea] The scientist. (<http://www.the-scientist.com>, research, nov. 2000).
- MAYNARD, L., LOESLI, J., HINTZ, H., WARNER, R. 1993. Nutrición Animal. 7 ed. Mc Graw-Hill de México, S.A. de C.V. México, México. 640 p.
- OBREGÓN, L. 1994. Uña de Gato. Género Uncaria. Estudios Botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima. Mariel Editorial y Exposiciones. Perú. 162p.
- QUEVEDO GUEVARA, A. 1995, Silvicultura de la uña de gato, alternativa para su conservación. CRI - IIAP Ucayali – Pucallpa, Pucallpa – Perú.
- RADI, R. y FREKMAN, B. 1996. Free Radical Biology. The Scientist. 10[18]:13. (<http://www.the-scientist.com>, hot papers, nov 2000).
- RAEDELEFF, R. 1967. Toxicología Veterinaria. Leon. España. Editora ACADEMIA. 378p
- RUNNELLS, R; MONLUX, W y MONLUX, A. 1970. Principios de Patología veterinaria. 7 ed. México. Compañía Editorial Continental S.A. 862p.
- SANDOVAL CHACON, M.; THOMPSON, J.H.; ZHANG, X-J; LIU, X; MANNICK, E.E.; SADOWSKA-KROWICKA, H; CHARBONNET, R.M.; CLARK, D.A. AND MILLER, M. S. 1998; Antiinflammatory

- action of cat's claw: the role of NF-KB.; *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 1279-1289.
- SANDOVAL, M., CHARBONNET, R.M., MILLER, M.J.S. 1999. Cytoprotective effects of resveratrol against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 27 (1): S42.
- SANDOVAL, M., CHARBONNET R. M, OKUHAMA N, ROBERTS J, KRENOVA Z, TRENTACOSTI AM, MILLER MJS. 2000. Cat's claw inhibits TN α production and scavenges free radicals: Role in cytoprotection. *Free Radical Biology & Medicine* 29:71-78;2000.
- SHUNKE VIGO J. 1993, Instituto Nacional de Medicina Tradicional. s.n.t.
- SCHULTES, C. AND RAFFAUF, R. F. 1990. *The Healing Forest, Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*. Dioscoroides Press. Portland. Oregon. U.S.A
- SIES, H. 1991. Oxidative stress: Introduction. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. H. Sies, ed, Academic Press, San Diego, California. pp 15 - 22.
- TIZARD, T. 1989. *Inmunología Veterinaria*. 3 ed. Nueva Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México. México 414p.
- WAGNER, H., KREUTZCAMP, B. AND JURCIC, K. 1985. The Alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their Phagocytosis Increasing Effect. *Plant Med*. Vol 51.
- WILCHES, Z. 1987. *Bioingeniería*. Editorial Universidad de Antioquía. Medellín, Colombia.

WILLSON, R. 1997. Free Radicals. Brunel University.

<http://www.brunel.ac.uk/~bcstrlw/info.html>

YEPEZ, P., LOCK, O. U., ALVARES, M.A., DE FEO, C. 1991. Quinovic Acid
Glicosides from *Uncaria guianensis*. *Phytochemistry*. 30(5).

X. ANEXOS

ANEXO 1. Determinación de ácido ascórbico (método 2,4 -
Dinitrophenylhydrazine)

Consiste en pipetar 0.5 ml de muestra y mezclar con 2 ml de ácido metafosfórico. Centrifugar a 900 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Pipetear 1.2 ml del sobrenadante y colocar en tubos por duplicado. Pipetear 1.2 ml por duplicado para cada estándar, adicionar 0.4 ml de reactivo DTC en todos los tubos mezclar e incubar a 37 °C por 3 horas.

Enfriar los tubos con un baño de agua helada por 10 minutos. Mezclar con mucho cuidado y adicionar 2 ml de ácido sulfúrico 12 M frío en cada tubo, mezclar y retornar inmediatamente al baño helado. Ajustar el espectrofotómetro a 520 nm, leer el blanco (ac. Metafosfórico), leer los estándares y las muestras.

Anexo 2. Cuadro de absorbancias (515 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa* al reaccionar con el DPPH (100 μ M).

Tiempo (minutos)	Absorbancias (515 nm)				
	0 μ g/ml	10 μ g/ml	100 μ g/ml	300 μ g/ml	1000 μ g/ml
00	0.899	0.867	0.867	0.867	0.867
01	0.900	0.756	0.715	0.641	0.517
02	0.862	0.729	0.572	0.426	0.159
03	0.862	0.720	0.516	0.319	0.105
04	0.862	0.715	0.462	0.250	0.091
05	0.862	0.711	0.425	0.205	0.085
06	0.861	0.708	0.388	0.173	0.083
07	0.860	0.706	0.371	0.153	0.081
08	0.861	0.704	0.351	0.138	0.079
09	0.859	0.702	0.334	0.133	0.079
10	0.859	0.700	0.318	0.118	0.078
11	0.859	0.699	0.310	0.115	0.079
12	0.859	0.697	0.311	0.112	0.078
13	0.859	0.695	0.318	0.109	0.079
14	0.859	0.694	0.309	0.106	0.078
15	0.859	0.691	0.291	0.103	0.078

Anexo 3. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado
Tratamientos	3	9576.00	3192.00	346.19 ***
Error	8	73.762	9.220	
Total	11	9649.70		

Anexo 4. Cuadro de absorbancias (515 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis*, al reaccionar con el DPPH (100µM)

Tiempo (minutos)	Absorbancias (515 nm)			
	10 µg/ml	100 µg/ml	300 µg/ml	1000 µg/ml
00	0.867	0.867	0.867	0.867
01	0.739	0.700	0.694	0.584
02	0.711	0.629	0.538	0.306
03	0.696	0.587	0.464	0.209
04	0.684	0.554	0.403	0.152
05	0.674	0.526	0.357	0.120
06	0.668	0.499	0.320	0.101
07	0.664	0.477	0.289	0.090
08	0.660	0.456	0.261	0.084
09	0.658	0.434	0.238	0.078
10	0.655	0.416	0.221	0.079
11	0.652	0.398	0.200	0.077
12	0.646	0.393	0.184	0.075
13	0.639	0.368	0.170	0.074
14	0.626	0.355	0.159	0.073
15	0.623	0.330	0.140	0.071

Anexo 5. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado
Tratamientos	3	7309.10	2436.40	143.94 ***
Error	8	135.41	16.927	
Total	11	7444.50		

Anexo 6. Cuadro de absorbancias (302 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa*, al reaccionar con el peroxinitrito (1mM)

seg	Absorbancias (302 nm)		
	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml
0	0.0871	0.4854	0.8661
10	0.097	0.4909	0.8832
20	0.0975	0.4624	1.0099
30	0.0975	0.4364	1.0641
40	0.0908	0.3325	1.1608
50	0.0889	0.2756	1.0124
60	0.0855	0.2744	0.9494
70	0.0827	0.2760	0.9322
80	0.0802	0.2552	0.9143
90	0.0803	0.2519	0.8616
100	0.0834	0.2608	0.7375
110	0.0864	0.2723	0.6951
120	0.0877	0.2847	0.6851

Anexo 7. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria tomentosa*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado
Tratamientos	2	2751.3	1375.7	234.82 ***
Error	9	52.726	5.858	
Total	11	2804.0		

Anexo 8. Cuadro de absorbancias (302 nm) del extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis*, al reaccionar con el peroxinitrito (1mM)

seg	Absorbancias (302 nm)		
	0.1 mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml
0	0.0947	0.5198	0.9621
10	0.0981	0.3616	0.9253
20	0.0908	0.1792	0.9264
30	0.0804	0.1415	0.9194
40	0.0551	0.1506	0.9148
50	0.0482	0.1775	0.8539
60	0.0530	0.1921	0.7878
70	0.0523	0.2050	0.7552
80	0.0447	0.2055	0.7394
90	0.0457	0.2000	0.7277
100	0.0458	0.2023	0.7280
110	0.0456	0.2096	0.6922
120	0.0461	0.2211	0.6263

Anexo 9. Análisis de varianza para el extracto acuoso de la hoja de *Uncaria guianensis*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculado
Tratamientos	2	10052	5026.1	381.83 ***
Error	9	118.47	13.163	
Total	11	10171		