

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Actividad energética y hepatoprotectora de las hojas de
baccharis lanceolata (chilca)**

TESIS

Para optar al Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Delia Yolanda Whu Whu

ASESOR

Dr. Jorge Arroyo Acevedo

Lima – Perú

2014

DEDICATORIAS

*A la memoria de mi madre **Delia**,
que siempre me alentò y que me estarà
viendo desde el cielo.*

*A mi padre **Rafael**,
por ser un ejemplo de trabajo y
perseverancia.*

*A mi esposo **Cesar** y mi hijo **Julio Cesar**,
por alentarme y apoyarme en los momentos
màs difciles.*

*A mis hermanos **Rafael, Sandra y Carmen**
Por apoyarme y brindarme su cariño.*

*Al Dr. **Irey Namijira**, por acogerme
en su Departamento de Microbiologia
como un miembro màs.*

*A la memoria de la Dra. **Luz Oyola H.**
Fuè mi mejor amiga y le debo sus
enseñanzas.*

A mis amigos:

Consuelo Ruelas

Mirtha Roque A.

Maria Elena Salazar

Julia R. Ruiz Quiroz

Robert Almonacid R.

Nelson Bautista C.

*Quienes han colaborado en el desarrollo de mi tesis y
han hecho posible su culminación.*

AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo
Amigo y asesor, quien me ayudó a la culminación
del presente trabajo de investigación.*

*A los jurados informante de la tesis
Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo
Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Por los valiosos aportes y sugerencias*

*A los miembros de los Jurados Examinador y Calificador
Dr. Gerardo Gamarra Ballena
Dra. Nancy Mafalda Lozano Reyes
Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo
Dra. Luzmila Troncoso Corzo
Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa*

*A las personas amigas que contribuyeron a la realización
de éste trabajo de investigación*

INDICE GENERAL

RESUMEN	Pág.
ABSTRACT	
CAPITULO I: INTRODUCCION	
1.1 Situación problemática	1
1.2 Formulación del problema	1
1.3 Justificación teórica	2
1.4 Justificación práctica	3
1.5 Objetivos.	
1.5.1 Objetivos específicos	3
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes de investigación	4
2.2 Bases teóricas	
2.2.1. Características de la planta	6
2.2.2. Clasificación taxonómica	7
2.2.3. Análisis químico	7
2.2.4. Bioenergética mitocondrial	8
2.2.4.1 Control respiratorio	9
2.2.4.2. Fosforilación oxidativa	9
2.2.4.3. Actividad de la citocromo oxidasa	10
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
3.1 Material	
3.1.1. Material biológico	12
3.1.2. Reactivos	12
3.1.3. Equipos de laboratorio	12

	Pág.
3.2 Métodos	
3.2.1. Investigación fitoquímica	12
3.2.1.1 Recolección, estabilización y desecación de la planta.	12
3.2.2.2 Preparación del extracto acuoso.	13
3.2.3.3 Análisis fitoquímico	13
3.2.4. Investigación bioquímica:	14
3.2.4.1 Preparación del homogenizado en hígado	14
3.2.4.2 Aislamiento de las mitocondrias	15
3.2.4.3 Determinación de la actividad respiratoria	15
3.2.4.4 Determinación de la actividad de la enzima citocromo oxidasa	16
3.2.4.5 Determinación de la actividad de la ATP sintasa.	17
3.2.4.6 Determinación de la actividad de las transaminasas	18
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Presentación de resultados	19
4.2 Análisis, interpretación y discusión de resultados.	27
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	34
ANEXOS	40

RESUMEN

Introducción: La función de la cadena respiratoria es importante para la homeostasis. **Objetivos:** Comprobar el efecto energético y hepatoprotector que puede producir el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K. en la cadena respiratoria. **Diseño:** Experimental. **Lugar:** Facultades de Farmacia y Bioquímica, Medicina - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Material biológico:** Ratas albinas, hojas de la planta. **Intervenciones:** En relación al efecto energético se ha evaluado la actividad respiratoria en mitocondria de hígado de rata a través del control respiratorio, actividad de la enzima ATPasa mediante hidrólisis del ATP y actividad Citocromo oxidasa; hepatoprotección en ratas administrándoles el extracto vía oral 14 mg/Kg. Las mitocondrias de hígado fueron obtenidas por centrifugación diferencial a 4°C. **Resultados:** Actividad respiratoria de los controles con los tratados fueron para el 1º mes 13.31 y 19.08, 2º mes 14.55 y 21.18 y 3º mes 15.15 y 23.63 micromoles de O₂/mg de proteína (p < 0.001). Actividad Citocromo oxidasa Control 0.333, tratados en el 1º mes 0.403, 2º mes 0.547 y 3º mes 0.613 micromoles/g de proteína (p < 0.001). Actividad ATPasa: Control 57.10, tratadas 1º mes 64.98, 2º mes 67.95 y 3º mes 69.50 micromoles de P/mg de proteína (p < 0.001). GPT: Control 28.33 U/l, 1º mes 25.06 U/l, 2º mes 12.0 U/l y 3º mes 30.5 U/l (p < 0.001). GOT: Control 35.83 U/l, 1º mes 25.61 U/l, 2º mes 12.50 U/l y 3º mes 37.16 U/l (p < 0.001). **Principales medidas de resultados:** Valores medios, Porcentajes de variación. **Conclusiones:** Se ha demostrado que el extracto acuoso aumenta la actividad del control respiratorio, enzima ATPasa, enzima Citocromo c oxidasa; siendo la hepatoprotección dependiente del tiempo.

Palabras clave: Mitocondrias, ATPasa, Citocromo c oxidasa, Control respiratorio Transaminasas.

ABSTRACT

Introduction: The function of the respiratory chain is important for homeostasis.
Objectives: To test the energy and hepatoprotective effect which can produce the aqueous extract of *Baccharis lanceolata* HBK in the respiratory chain. **Design:** Experimental. **Location:** Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Medicine - National University of San Marcos, Lima, Peru. **Biological material:** albino rats, plant leaves. **Interventions:** In relation to the energy effect was evaluated respiratory activity in rat liver mitochondria via the respiratory control enzyme activity by hydrolysis of ATP ATPase and cytochrome oxidase activity ; hepatoprotection extract in rats orally administering 14 mg / Kg Liver mitochondria were obtained by differential centrifugation at 4°C . **Results:** Respiratory Activity of controls were treated for 1 month 13.31 and 19.08, 14.55 and 2nd month 3rd month 21.18 and 15.15 and 23.63 micromoles of O₂/mg protein (p < 0.001). Cytochrome Oxidase Activity Control 0.333 , treated 0.403 1 month , 2 months and 3 months 0.547 0.613 micromoles / g of protein (p < 0.001) . ATPase activity: Control 57.10, 64.98 treated 1 month, 2 months and 3 month 67.95 69.50 micromoles of P / mg of protein (p < 0.001) . GPT: Control 28.33 U / l, 1 month 25.06 U / l, 2 months 12.0 U / l 3rd month 30.5 U / l (p < 0.001) . GOT: Control 35.83 U / l, 1 month 25.61 U / l, 2 months 12.50 U / l 3rd month 37.16 U / l (p < 0.001). **Main outcome measures:** Mean values , percentages of variation. **Conclusions:** It has been shown that the aqueous extract increases the activity of respiratory control ATPase enzyme, cytochrome c oxidase enzyme, with the dependent time hepatoprotection .

Keywords: Mitochondria , ATPase , Cytochrome c oxidase , Respiratory control Transaminases .

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación problemática:

En las últimas décadas se ha demostrado la eficiencia terapéutica de muchas preparaciones elaboradas a base de plantas medicinales, (Rodríguez Amado, et.al 2011), una de ellas podría ser *Baccharis lanceolata* H.B.K. de la familia Asteráceas. Esta posee principios activos de fenoles y flavonoides, también contienen taninos y alcaloides en menor proporción (Whu, 1999) y a estos componentes se les atribuyen efectos curativos sobre determinadas enfermedades (Avalos, 2009; Virgili F, 2008). Diversos investigadores de muchos países y aun en el nuestro han desarrollado estudios sobre plantas medicinales que benefician a la salud de los pobladores que carecen de acceso a la medicina convencional (Zampini 2005; Palacios, 1992; Jurupe et.al, 1995; Klinar et.al 1995). Las plantas medicinales y frutos tropicales contienen moléculas derivadas de polifenoles (Williamson, 2009), que poseen alta capacidad para neutralizar las acciones nocivas que producen radicales libres sobre nuestro organismo, siendo los más representativos los flavonoides como la quercetina, la galangina, la catequina y otros. (Bustos, 2010; Saura Calixto, et.al., 2010).

También la cadena respiratoria mitocondrial produce radicales superóxido dismutasa (SOD) convirtiéndolas en peróxido de hidrogeno siendo menos dañinos para el organismo. (Bustos, 2010). Se han hecho estudios encontrándose en *Baccharis lanceolata* H.B.K. que contiene flavonoides como flavonas y flavonoles (Whu, 1999), a los cuales se les atribuyen efectos antiinflamatorios. También se les ha determinado efectos hepatoprotectores, diuréticos y antirreumáticos (Whu, 1999; Kukliski, 2000).

1.2 Formulación del problema :

¿El extracto acuoso de las hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K. administrado por vía oral aumenta la actividad energética y la actividad de la ATPasa en hígado de rata?

1.3 Justificación teórica :

Los flavonoides constituyen un extenso grupo de compuestos fenólicos, por lo general insolubles y ampliamente distribuidos entre las plantas. La estructura básica de la flavona es una 1,4 benzopirona con restitución del grupo fenilo en posición 2. Las oxidaciones en el grupo hidroxilo permiten que los flavonoides naturales se combinen con azúcares para formar glúcidos. También pueden formar quelatos con metales, tienen efecto antioxidante evitando los daños por formación de radicales libres, sobre todo en entrenamientos de calidad (Broks, et al., 1985).

El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, es decir, la disociación entre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP, puede hacer disminuir la formación de O_2^- en la mitocondria de manera considerable. Se ha demostrado que bajas dosis de desacoplantes incrementan de manera sistemática la tasa respiratoria in vivo y previene el daño oxidativo en las biomoléculas. Al incrementar el consumo de O_2 aumenta el transporte de electrones y se previene la formación de ROS porque decrece la tensión de O_2 en la mitocondria. Otro efecto derivado del aumento del transporte de electrones es que se favorecen los niveles de oxidación de los intermediarios de la cadena respiratoria, lo que evita que se ceda electrones al oxígeno molecular (Barja G, 1999).

Debido al fuerte carácter reductor del ambiente intramitocondrial, diversos componentes de la cadena respiratoria, entre los que se incluyen flavoproteínas, centros sulfoférricos y la ubisemiquinona, son termodinámicamente capaces de transferir un electrón al oxígeno. Además hay que tener en cuenta que la mayoría de los pasos de la cadena respiratoria son reacciones en las que se implica a un solo electrón (Bartosz G, 2009). Hay que señalar que existen mecanismos disipadores de energía están también regulados por las condiciones metabólicas, de manera que el metabolismo energético mitocondrial y el estado rédox celular están íntimamente relacionados, como podrían hacerlo los compuestos fenólicos. Mientras que el incremento de la tasa respiratoria mitocondrial previene la formación de ROS, las condiciones patológicas que inducen un flujo de electrones más lento se acompañan de un incremento en los niveles de ROS de origen mitocondrial (Kowaltowski et al., 2009).

Se han hecho estudios encontrándose en *Baccharis lanceolata* H.B.K. que contiene flavonoides como flavonas y flavonoles (Whu, 1999), a los cuales se les atribuyen efectos antiinflamatorios. También se les ha determinado efectos hepatoprotectores, diuréticos y antirreumáticos (Whu, 1999; Kukliski, 2000).

1.4 Justificación práctica:

Con la presente investigación se amplía el conocimiento sobre *Baccharis lanceolata* H.B.K. para contribuir a un mejor uso de ésta especie, dado que frecuentemente es empleada por los pobladores de escasos recursos económicos para varias dolencias, siendo la principal como protector hepático. Al haberse realizado el estudio en hígado de *Rattus norvegicus albinus* se comprueba que una solución acuosa de hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K. por contener compuestos fenólicos es productor energético en la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que corrobora su uso como hepatoprotector.

1.5 Objetivos :

Demostrar que el extracto acuoso de hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K. “chilca”, contribuyan a la formación de enlaces altamente energéticos (ATP) y actúe como hepatoprotector para dar la seguridad de que no actúe como un tóxico.

1.5.1 Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad energética (micromoles de P/mg de proteína) a través del control respiratorio y P: O en mitocondrias de hígado de ratas normales.
2. Determinar el nivel de ATPasa (micromoles de P/mg de proteína) por hidrólisis del ATP en la mitocondria de hígado de rata normal.
3. Observar la actividad de la Citocromo oxidasa en la mitocondria de hígado de rata normal.
4. Evaluar la seguridad hepática del extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K. “chilca”, estableciendo los niveles séricos de transaminasas plasmática: GPT (U/l) y GOT (U/l) en ratas normales.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de investigación:

Investigación Nacional:

Estudios de actividad biológica:

1. Mecanismo de Transformación Energética a nivel mitocondrial (Oyola, L. 1917).
Se ha estudiado algunos aspectos de la velocidad del proceso de transformación energética que tiene lugar durante la fosforilación del ADP a nivel mitocondrial, tanto en hígado como corazón de cobayo nativos del nivel del mar. Se encontró que existe una relación directa entre la velocidad de reacción y concentración de proteína y que influye sobre el Km para el ADP a la concentración de 4 mg/ml y por encima de ésta la velocidad máxima disminuye. Se ha demostrado la influencia de la presión de oxígeno sobre la velocidad máxima de fosforilación oxidativa disminuye bajo los efectos de la presión de oxígeno. En cambio, los valores de Km para el ADP en función de la concentración de oxígeno no se modifican. El tipo de sustrato (A) oxidado, origen tisular de las mitocondrias influyen sobre la velocidad respiratoria (Estado 3 y 4) y sobre el KM para el ADP.
2. Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidracina en ratas. (Justil, H., et al 2010). Han encontrado que en ratas, el extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* tiene efecto quimio protector sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina.
3. Estudio fitoquímico y actividad biológica de *Baccharis lanceolata* (Whu, 1999). Donde la fracción metanólica – III por reacciones físico-químicas y espectroscopía UV-V se determinaron 2 flavonas y un flavonol, además rutina y quercetina. Farmacológicamente se demostró el efecto antiinflamatorio probablemente debido a la presencia de flavonoides, el efecto diurético y cicatrizante por el contenido de taninos catéquicos, fenoles y alcaloides.

4. La actividad energética ha sido estudiada en *Piper callosum* R y P “huayusa”. (Burgos, Dorregaray y rodriguez,1996). *Piper callosum* R y P “ huayusa “ es una planta nativa de la selva (Juanjui), usada por los habitantes de la zona como antirreumático y estimulante. Se le hizo estudios bioquímicos a nivel mitocondrial, los ensayos fueron realizados en ratas a las cuales se les administró extractos de la planta a diferentes dosis y determinaron la actividad de la ATPasa, observándose un aumento de la actividad. Se han hecho evaluaciones de la actividad de 3 extractos de la planta *Baccharis latifolia* (acuoso, metanólico, diclorometano) en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), relacionados al estrés oxidativo (Abad M, Bessa A. et. al. 2006).
5. Actividad de ATPasa en corazón de cobayos de altura. (Oyola,L. 2004). Compara la actividad de la ATPasa, la relación de ADP:O y el control respiratorio en mitocondria de corazón de cobayos a nivel del mar y altura. Los resultados sugieren que los cobayos de altura han desarrollado la habilidad de realizar la fosforilación oxidativa en forma más eficiente, y el ligero incremento observado en la actividad de la ATPasa indica que tal vez se realizan pequeños ajustes para mantener el equilibrio dentro del medio ambiente mitocondrial.
6. Acción de la complamina sobre la ATPasa mitocondrial en hígado de cobayo. (Tapia, B. 1996). Estudios de la acción de la complamina que es un vaso dilatador periférico sobre la actividad de la enzima ATPasa mitocondrial se concluyó:
- Utilizando la diferencia crítica de Dunnet para la actividad específica de ATPasa y actividad total no se obtuvo diferencia significativa entre los tratados y el control.
 - Al no ser afectada la integridad de la membrana mitocondrial, la complamina puede ser utilizada como un medicamento energizante para los problemas de hipoxia.

Investigación Internacional

Estudios de actividad biológica:

1. Potencialidades fitoterapéuticas de dos Especies de *Baccharis* De la Puna de Atacama-Argentina. (Zampini, I., 2005). Las especies de estudios fueron *Baccharis incarum* y *Baccharis boliviensis* que crecen en zonas de 3800 metros sobre el nivel del mar. Los pobladores usan ambas especies como protector gástrico y hepático. Los resultados demuestran el potencial antioxidante y antimicrobiano de las especies estudiadas y justificarían su utilización en la conservación de alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos evitando las reacciones oxidativas como así también su uso en medicina como antibiótico de amplio espectro y en la prevención de enfermedades degenerativas crónicas (cáncer, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares y neurodegenerativas) y en los procesos de envejecimiento.
2. Evaluation of the inhibitory activities of aceraceous plants on fatty acid synthase. (Zhao, WH., et al. 2007). La sintasa de ácidos grasos (FAS), es una enzima lipogénica que participa muy significativamente en el metabolismo energético y se ha reportado como un potencial específico para el tratamiento de cáncer. Tres extractos de Aceráceas fueron seleccionados y son muy eficientes inhibidores de la enzima FAS a dosis de 0.41 microgramos/ml y presentaron una inhibición (50%) frente al crecimiento de 5 tipos de células cancerígenas, las cuales pueden estar relacionados a la inhibición de la lipogénesis de esas células.

2.2. Bases teóricas:

Características de la planta:

Baccharis lanceolata H.B.K. "chilca" es una planta que pertenece a la Familia Astereaceae y del género *Baccharis*. El género *Baccharis* se encuentra distribuido en América del Sur y diseminado por todo el Perú; crecen principalmente cerca de los ríos, sobre arena y guijarros. *Baccharis lanceolata* H.B.K. "chilca" es un arbusto de 1 a 1.5 metros de alto, de tallo muy ramificado y densamente folioso. Sus hojas

son simples, subsésiles, disposición alternas, de forma ovalado-espatulado, con dientes marginales hasta el ápice de un color verde intenso y brillante. (Whu, 1999).

La planta contiene metabolitos secundarios que se producen a través de la fotosíntesis por la vía de ácido shikímico a partir de 3 y 4 carbonos como es el ac. Fosfoenolpiruvico (PEP) y la eritrosa – 4 – P. (E4P) por una condensación de tipo aldólica produciendo un compuesto de C₇. (Peña, A.)

Clasificación taxonómica:

Taxonómicamente ha sido identificada en el Museo de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima).

DIVISIÓN:	ANGIOSPERMAS
CLASE:	DICOTILEDONEAS
SUBCLASE:	SYMPETALAS
ORDEN:	CAMPANULADAS
FAMILIA:	ASTERACEAE
GENERO:	<i>Baccharis</i>
ESPECIE:	<i>Baccharis lanceolata</i> H.B.K.
Nombre vulgar:	“chilca”

Análisis químico:

En los estudios fitoquímicos se han encontrado en las hojas de *Baccharis lanceolata* “chilca” que contiene fenoles, flavonoides, taninos y alcaloides, en mayor proporción los flavonoides.

Espectrofotométricamente haciendo un análisis de caracterización se determinaron 2 flavonas (5,3'-di hidroxí-7,4—di-o-metil-6,8-di-C-glicósido flavona; 7-o-glicósido-5,4'-di-hidroxí-6,8-di-o-metil flavona) y un flavonol (5, 7, 3, 4'-tetrahidroxí-3-o-ramnoglicosyl flavonol. (Whu, 1999).

Usos de la especie en estudio:

Los pobladores la usa como droga cruda con propiedades antirreumática, antiinflamatoria, analgésica y diurética (Klinar y col. 1995).

Las hojas limpias pueden ser aplicadas directamente sobre las heridas ó afecciones en la piel. Las hojas soasadas se aplican sobre los sitios de fracturas óseas para desinflamar y ayudar a la consolidación. (Editor, Garcia Idrobo et.al,1988). Las hojas aplicadas en forma de cataplasma se usan para calmar los dolores reumáticos y de cintura. (Editor, 1988; García, 1992). Estas especies contienen flavonoides a los que se les atribuye propiedades farmacológicas como protectoras de la pared vascular, venotónicos, antioxidantes, antiespasmódicos, hepatoprotectores, antihemorrágico, antibacteriano y antivirales. (Kukliski C. 2000; Robak J,Gryglewski R. 1996). También contienen alcaloides cuya acción farmacológica son antitumorales, estimulantes, hipotensora, antibacterial, antiinflamatoria. (Look, O. 1988).

Bioenergética mitocondrial:

Las mitocondrias son organelas intra citoplasmáticas encargadas del metabolismo energético celular. El ADN mitocondrial fue identificado por primera vez en 1960 y descrito como una estructura de doble hebra circular, constituida por 16,569 pares de bases. La importancia del genoma mitocondrial radica en que él mismo codifica 13 polipéptidos involucrados en la cadena de transporte de electrones, 2 ácido ribonucleicos (ARNs) ribosomal y 22 ARNs de transferencia necesarios para el funcionamiento normal de la célula. El resto de las proteínas de la cadena respiratoria se producen en el núcleo. El genoma nuclear a su vez codifica traslocasas que son componentes de la maquinaria de transporte proteico mitocondrial así como también factores esenciales para la transcripción, traducción y replicación del ADN mitocondrial (Hamana, 2002).

Las mitocondrias son las organelas celulares encargadas de la obtención de la energía necesaria para las correctas funciones celulares. En ellas el piruvato y los ácidos grasos obtenidos a partir de las sustancias dietéticas pasan por el ciclo de Krebs y posteriormente por el proceso denominado fosforilación mitocondrial

oxidativo para obtener ATP principal molécula energética del cuerpo. (Rodríguez-Enriquez 2005 , Monge, 2009).

Para evaluar la actividad mitocondrial se consideran:

1.- Control respiratorio:

En 1940 E.Kenmdy y Lehninger descubrieron que las mitocondrias contenían el sistema respiratorio, las enzimas del ciclo del ácido cítrico y la oxidación de los ácidos grasos. (La Padula 2010 , Rasmusson, A. 2008).

En condiciones fisiológicas, el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial está acoplado a la fosforilación de ATP. Los electrones pueden fluir solo si el ADP es simultáneamente fosforilado a ATP. Así el consumo de oxígeno mitocondrial está regulado por el aporte de NADH, ADP y Pi. (Oyola 2004)

La regulación de la velocidad de fosforilación oxidativa por los niveles de ADP se denomina Control respiratorio y esto viene a ser la relación entre la respiración en el estado 3 y el estado 4. (Boveris ,1988, Spach, P. 1987).

Otro índice para evaluar la actividad mitocondrial es la relación P: O, es decir la relación entre el fosforo incorporado al ATP y el oxígeno consumido al oxidar el sustrato.(Martinez, F. 1993).

Tanto el control respiratorio y la relación P: O expresan el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y fosforilación. (Gonzales-Calvar 2004).

2.- Fosforilación oxidativa:

Las mitocondrias constituyen las organelas claves en la producción de ATP celular y son las encargadas de aportar la energía necesaria para la función celular. (Ruelas. 1985).

La Fosforilación oxidativa, está compuesto de cinco complejos enzimáticos multipolipeptídicos, localizados en la membrana mitocondrial interna. La energía liberada por éstos complejos proteicos es utilizada para bombear protones desde la matriz mitocondrial a través de la membrana interna al espacio intermembrana y el gradiente electroquímico resultante sirve como fuente de energía potencial para

el complejo V adenosintrifosfato (ATP sintetasa), el cual se encarga de la síntesis de ATP a partir de adenosindifosfato (ADP) y fosforo inorgánico (Pi). (Minauro, 2005).

Complejo I: NADH: Ubiquinona oxidoreductasa

Complejo II: Succinato:Ubiquinona oxidoreductasa

Complejo III: Ubiquinona: citocromo c oxidasa.

Complejo IV: Citocromo c oxidasa

Complejo V: ATP sintetasa,PDH: Piruvato Deshidrogenasa

De ésta manera, la generación de ATP por la célula, es controlada tanto por el ADN mitocondrial como el ADN nuclear. A su vez, la energía mitocondrial depende de factores genéticos que modulan la función normal de la mitocondria incluyendo la actividad enzimática, disponibilidad del cofactor y/o factores ambientales tales como la incorporación al organismo de azúcares, grasas, proteínas y oxígeno. (Hamana 2002).

Las mitocondrias mediante la utilización del oxígeno molecular (O_2), permite obtener una gran cantidad de energía. Sin embargo, éste aumento en la eficiencia energética tiene su lado negativo. La molécula de oxígeno tiene una gran afección por los electrones y durante todo el proceso mitocondrial, genera radicales libres de oxígeno (ROS) que provocan daños en diversas estructuras y funciones celulares, empezando por la propia mitocondria.

3.- Actividad de la Citocromo oxidasa.

Los citocromos son proteínas que poseen un grupo prostético hemo. Durante el transporte de electrones, el átomo de hierro de los citocromos alterna entre un estado reducido ferroso (+2) y un oxidado férrico (+3). El grupo hemo transfiere un solo electrón, la coenzima Q reducida debe transferir sus 2 electrones a 2 moléculas de citocromo b. (Melo, V et al 2004).

Los potenciales redox de los citocromos aumentan secuencialmente. Los electrones son transferidos al citocromo a y luego al citocromo a₃ que contiene cobre y que son los miembros terminales de la cadena respiratoria y existen como complejo, integrando la citocromo oxidasa. Este átomo de cobre alterna entre la forma oxidada (+2) y la reducida (+1) a medida que transfiere los electrones del citocromo a₃ hasta el oxígeno molecular. La enzima citocromo oxidasa de la cadena respiratoria cataliza la oxidación del citocromo c. (La Padula 2010). El metabolismo humano produce en forma intrínseca ROS. Incluso cuando la mitocondria funciona en forma óptima bajo las condiciones más favorables, un 5% del oxígeno que utiliza se convierte en ROS (Pasdois,P et al. 2011). Ha sido demostrado que la exposición prolongada a los radicales libres puede dar lugar a daño oxidativo de las proteínas celulares y mitocondriales, lípidos y ácido nucleicos. A corto plazo, los ROS pueden inactivar los centros hierro-sulfuro de los complejos I,II y III de la Cadena de transporte de electrones y la aconitasa del ciclo del ácido tricarbóxico con la posterior caída del metabolismo energético mitocondrial. (Hamana 2002).

Los organismos disponen de sistemas antioxidantes de defensa, los cuales no son 100% eficientes y las células acumulan daños en forma progresiva, especialmente las propias mitocondrias. Este daño acumulativo provoca una pérdida progresiva de eficiencia de los procesos fisiológicos, incluyendo una menor capacidad de separación del daño producido. En la mitocondria éste daño hace que tenga más dificultades para el manejo de los electrones liberados, con una pérdida de integridad funcional que por un lado disminuye la capacidad de producción de energía (disminuyendo su capacidad de regeneración) y por otro incrementa la fuga de electrones (que a su vez incrementa el daño oxidativo). (Ko, Kam et al).

CAPITULO 3: METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES:

3.1.1. Material Biológico

1. Hojas secas de *Baccharis lanceolata* "chilca"
2. Animales de experimentación:

Se empleó cepas de ratas albinas *Rattus norvegicus albinus*.

3.1.2. Reactivos:

1. Sucrosa 0.1 M Q.P. Merck
2. Fosfato buffer 0.1 M, pH 7.4
3. Solución de malato 0.1 M, pH 7.4 Q.P Sigma Chemical
4. Solución de succinato 0.1 M, pH 7.4 Q.P Sigma Chemical
5. Solución de ADP 0.1 M Q.P Sigma Chemical
6. ATP asa, Q.P Sigma Chemical
7. Kit de Citocromo c oxidasa, Sigma Chemical.
8. KCl 0.075 M Q.P Merck
9. EDTA 0.001 M Q.P Merck
10. ATP 0.002 M Q.P Sigma Chemical.
11. Kit de Adenosine 5'- triphosphate (ATP asa), Sigma Chemical.

3.1.3. Equipos de laboratorio:

1. Espectrofotómetro UV/ Vis Hewlett-Packard
2. Centrifuga refrigerada International tipo RC 2-B
3. Oxímetro con electrodo de oxígeno Polarographic Clark Schnaitman

3.2.- METODOS:

3.2.1.- Investigación fitoquímica

3.2.1.1.- Recolección, estabilización y desecación de la planta:

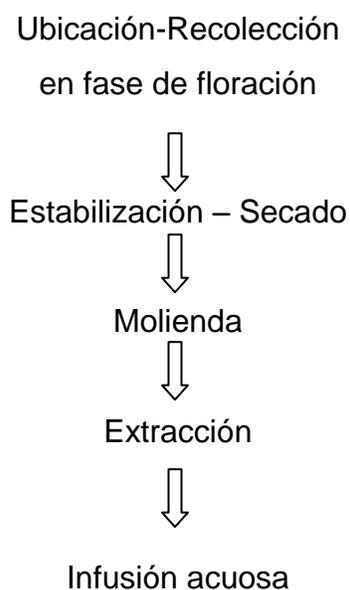
Se recolectaron las hojas en las chacras de Huarmey, que se encuentra a nivel del mar en el Departamento de Ancash, época de floración en julio del 2011. Se

lavaron, limpiaron y se dejaron desecar a la sombra. Luego fueron trituradas y guardados en un frasco de color ámbar para su posterior utilización.

3.2.2.2: Preparación del extracto acuoso:

Se pesaron 100 g de hoja seca trituradas, se pusieron en infusión, se filtró y se desecó en refrigeración a 5°C por 5 días y se obtuvo un residuo seco de color verde oscuro con un rendimiento del extracto acuoso de 70%.

DIAGRAMA DE FLUJO



3.2.3. Análisis fitoquímico:

Análisis fitoquímico preliminar de acuerdo a la metodología de Olga Look (1994).

Se determinó con diferentes reactivos los metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, taninos y alcaloides.

Tabla 1. Ensayo fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de *Baccharis lanceolata* (chilca).

REACCIONES	METABOLITOS SECUNDARIOS	CANTIDAD DE COMPONENTES
Cloruro férrico	Fenoles	+ +
Shinoda	Flavonoides	+ + +
Reactivo de gelatina	Taninos	+ +
Reacción de Dragendorff	Alcaloides	+ +

++ (Regular cantidad); +++ (Bastante cantidad)

3.2.4. Investigación Bioquímica:

Se trabajaron con 36 ratas *Rattus norvegicus albinus*, formando 6 grupos al azar de seis animales cada uno, un grupo recibió el solvente agua, los otros grupos recibieron la infusión de chilca en dosis de 14 mg/kg por vía oral a 30, 60 y 90 días respectivamente. Cumplidos los tiempos cada grupo se les fue sacrificando y extrayendo el hígado y se colocaron en un recipiente que contiene una solución de Sucrosa 0.25 M a 0°C, luego se procesaron los homogenizados por centrifugación diferencial para la obtención de las mitocondrias.

3.2.5. Preparación del homogenizado en hígado:

Para la preparación de las mitocondrias, se usó el método descrito por el método de Schneider modificado, Oyola, 1957.

Extraído el hígado de las ratas, se coloca inmediatamente en solución de sucrosa 0.25 M a 0°C. Se pesa el total del hígado, se le añade 5 veces su peso de sucrosa helada 0.25 M.

Se tritura y luego se coloca en los homogenizadores de Potter Eveljhem, procediéndose al homogenizado el cual es sumergido en un baño de hielo durante

el procedimiento, evitándose velocidades excesivas para no fraccionar las mitocondrias.

3.2.6. Aislamiento de las mitocondrias:

El homogenizado se distribuye en tubos de celulosa, es centrifugado a 600 x g por 10 minutos, la fracción sobrenadante se decanta y se guarda. El residuo contiene células, fragmentos de tejidos y algunas mitocondrias, se lava con la mitad de volumen de sucrosa, se homogeniza y se centrifuga a 600 x g por 10 minutos; la fracción sobrenadante se combina con la anterior y el residuo se desecha.

Los sobrenadantes se vuelven a centrifugar a 8,700 x g durante 10 minutos, el sobrenadante se desecha y el residuo es resuspendido con sucrosa con la tercera parte de volumen original de sucrosa y se centrifuga a 12,100 x g por 10 minutos, se decanta y se resuspende el residuo con sucrosa, se centrifuga a 16,000 x g por 10 minutos, se anota el volumen final (Oyola,HL. 1971) y se procede a determinar el contenido de proteínas y realizar las determinaciones polarográficas.

Se determinó las proteínas en la suspensión por el método de Biuret Weichselbaun usando como patrón de referencia el Laptrol. (Oyola ,HL. 1966).

3.2.7. Determinación de la actividad respiratoria:

Obtenidas las mitocondrias de hígado se le hicieron los registros polarográficos para determinar la pureza e integridad de las mismas (Ochoa Severo, 1955), con un polarógrafo que tiene un electrodo de oxígeno Clark conectado a un espectrofotómetro Hewlett-Packard y unido a un recorder Sargent Welch de doble canal SKG.(Método de Tyler, 1967, Camara ,Y. 2005).

Los cambios en la velocidad del exceso de consumo de oxígeno/ min y mg de proteína se determinó añadiendo a determinada concentración ADP al medio de fosforilación, lo cual provoca un rápido aumento en el consumo de oxígeno. (Oyola, L. 2004)

Temperatura 25 °C

Lectura a 550 nm por minuto

La diferencia del coeficiente de extinción entre el citocromo reducido y oxidado es 21.48 (Berry, 1987).

Cálculos:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{\text{DA/min} \times \text{dilución} \times 1.1}{(\text{vol. de enzima}) \times 21.84}$$

Una unidad oxidaría 1.0 micromoles de ferrocitocromo c por minuto

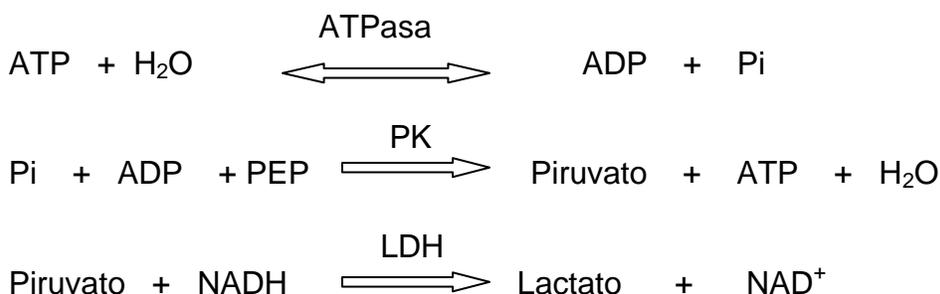
3.2.9. Determinación de la actividad de la ATP sintasa:

Se usó el método de Pullman modificado por R.W.Egan, 1960, para la determinación de la hidrólisis del ATP.

La medida de la actividad específica está basada en que la ATPasa cataliza la hidrólisis de ATP a ADP y Pi en presencia de Mg⁺². El fosfoenol piruvato en presencia de la Piruvato quinasa pasa a piruvato con liberación de agua y ATP.

Luego se le adicionó la enzima LDH, que cataliza el paso de piruvato a lactato y la disminución de la NADH se midió a 340 nm.

Reacción del ensayo:



Procedimiento:

- Solución Tris-Acetato buffer pH 7.4 50 micro moles
- PEP 0.02 M 2 micro moles
- NADH 1.53 M 0.2 micro moles
- LDH 13 micro gramos
- PK 32 micro gramos
- ATP 0.1 M pH 7.4 2 micro moles
- Proteínas mitocondriales 0.94 mL (0.04 mg de proteína / ml)
- Volumen total 2.00 mL

Temperatura 25 °C

Leer a 340 nm

Cálculos:

$$AE = \frac{(A/\text{min}) (\text{Volumen total en cubeta}) \times 1 \times 13 \text{ moles NADH oxidado}}{(\text{mg de proteína en cubeta}) \times 6.22 \text{ min} / \text{mg de proteína}}$$

3.2.10 Determinación de la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica: Método de Reitman y Frankel (1957).



El Piruvato u Oxaloacetato formado reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidrazina, generando en medio alcalino una hidrazona coloreada que absorbe a 505 nm.

CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Presentación de resultados.

Tabla 1. CONTROL ACTIVIDAD RESPIRATORIA

Control	Media	Error Estándar	Desviación Estándar	Nº
1º mes	13,31	0,409	1,83	20
2º mes	14,55	0,499	2,23	20
3º mes	15,15	0,446	1,99	20

En el cuadro de Control de actividad respiratoria se observa que los valores medios se incrementan ligeramente a medida que pasan los meses.

Tabla 2. CONTROL ACTIVIDAD RESPIRATORIA. COMPARACIONES MULTIPLES

	(I) meses	(J) meses	Diferencia de medias (I-J)	Error Estándar	Sig.	Intervalo de confianza 95 %	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	1ºmes	2ºmes	-1.25	0.6403	0.136	-2.79	0.3
		3ºmes	-1.85	0.6403	0.015	-3.39	-0.3
	2ºmes	3ºmes	-0.6	0.6403	0.619	-2.14	0.94

Variable dependiente Solo hay una diferencia significativa entre las medias de Actividad respiratoria entre 1º mes y 3º mes, con un $p= 0.015$

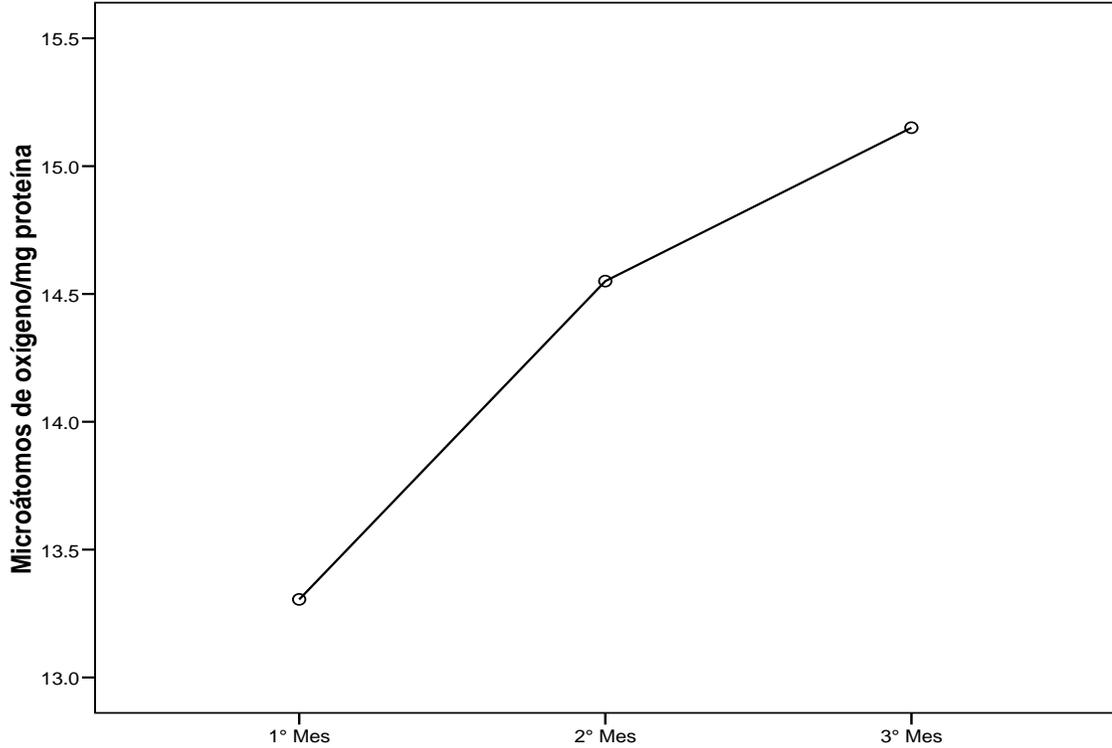


Figura 1. Control. Valores medios de actividad respiratoria

Tabla 3. *Baccharis lanceolata* H.B.K. "chilca". ACTIVIDAD RESPIRATORIA. DESCRIPTIVOS

	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar
1º mes	20	19,08	1,08	241
2º mes	20	21,08	1,28	286
3º mes	20	23,63	1,7	380

Con relación a la Actividad respiratoria tratados con extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K. "chilca", se observa que a medida que pasan los meses se van incrementando los valores medios. Si se comparan los grupos se encontró que las diferencias de medias de la actividad respiratoria son significativas.

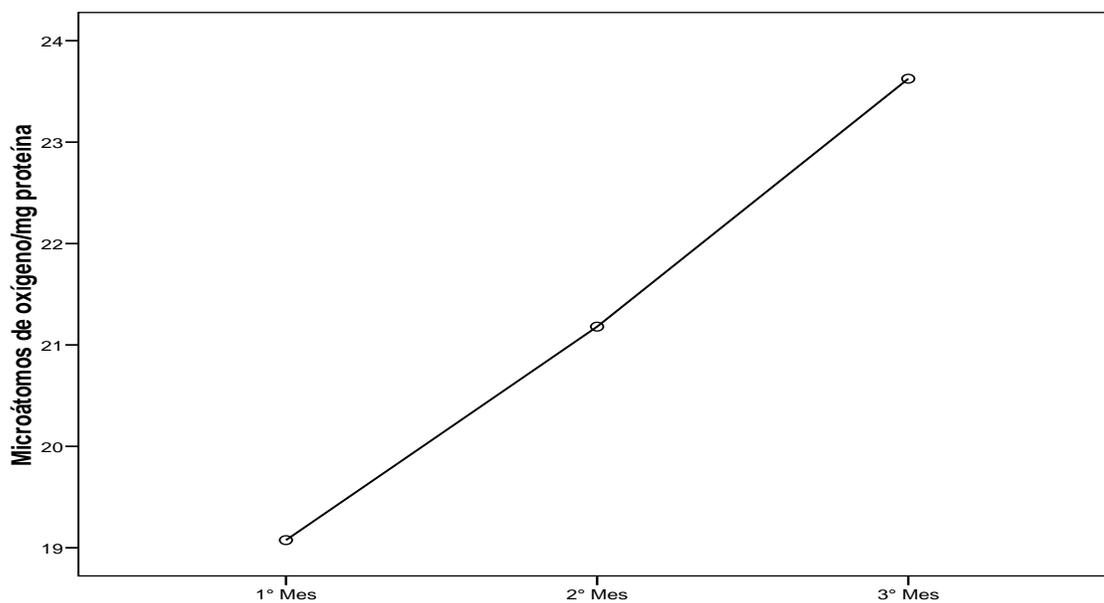


Figura 2. Chilca. Valores medios de Actividad respiratoria

Tabla 4. Actividad respiratoria, estadística descriptiva.

Grupo	N	Media	Desviación std	Error std
1° Mes				
Control	20	13.31	1.83	.409
Chilca	20	19.08	1.08	.241
2° Mes				
Control	20	14.55	2.23	.499
Chilca	20	21.18	1.28	.286
3° Mes				
Control	20	15.15	1.99	.446
Chilca	20	23.63	1.70	.380

Al hacer las comparaciones de los valores medios de la Actividad respiratoria de los controles con los tratados con extracto de chilca, se encontró que las tres diferencias son significativas con un $p < 0.001$.

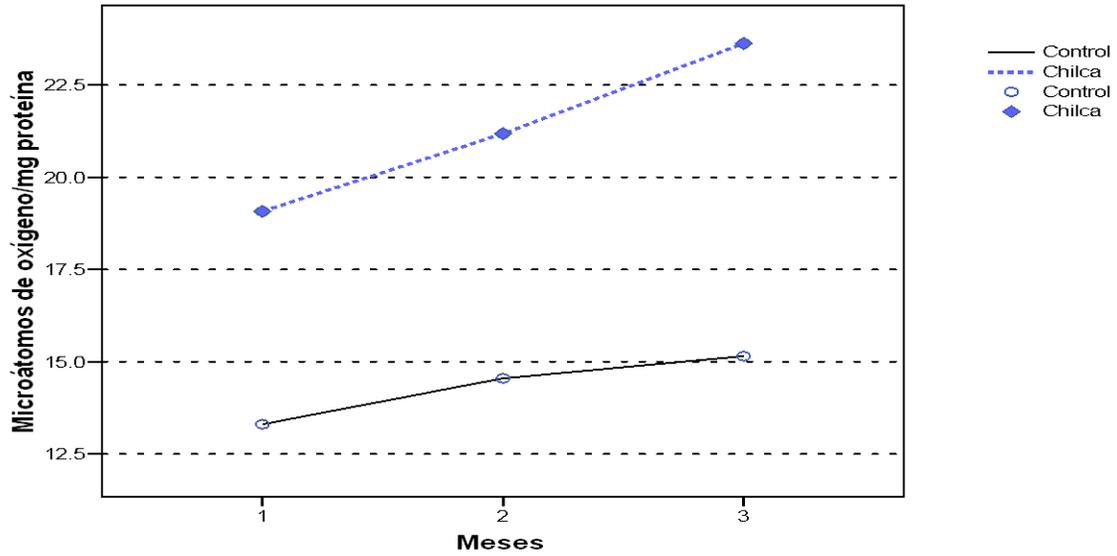


Figura 3. Valores medios de Actividad respiratoria

Tabla 5. Actividad Respiratoria. Comparación de medias Chilca vs Control

	Prueba de Levene para igualdad de varianzas		Prueba de T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error std	Inferior IC95%	Superior IC95%
1°Mes Se asume varianzas iguales	2.530	.120	-12.141	38	.000	-5.77	.475	-6.73	-4.81
2°Mes No se asume varianzas iguales	5.362	.026	-11.538	30.26	.000	-6.63	.575	-7.80	-5.46
3°Mes Se asume varianzas iguales	.554	.461	-14.463	38	.000	-8.48	.586	-9.66	-7.29

Tabla 6. Estadística descriptiva de los datos obtenidos al evaluar la citocromo oxidasa

	Media	Error Estándar	Desviación Estándar	Nº
Control	0,333	0,08	0,038	20
1º Mes	0,403	0,005	0,022	20
2º Mes	0,547	0,026	0,117	20
3º Mes	0,613	0,023	0,102	20

Referente a la Citocromo oxidasa, se observa que los valores de las medias se incrementan del 1º al 3º mes con respecto al control.

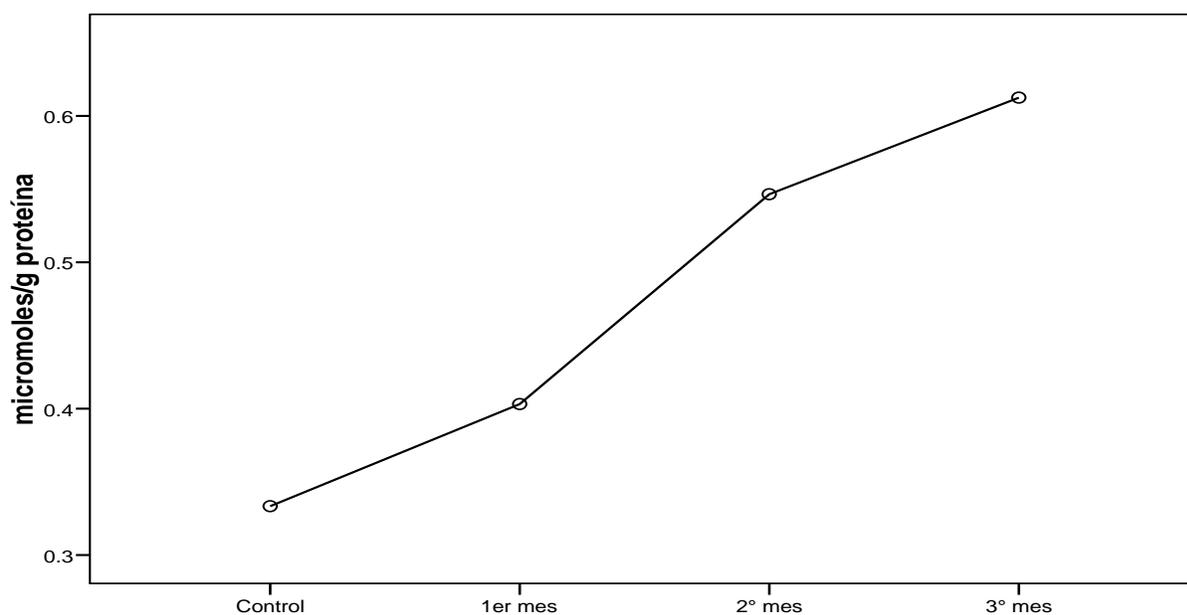


Figura 4. Valores medios de Citocromo Oxidasa

Tabla 7. Comparaciones múltiples al evaluar la citocromo oxidasa

(I)gru	(J)gru	Diferencia de medias (I-J)	Error std	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1°mes	Control	.070*	.025	.021	.009	.131
2°mes	Control	.213*	.025	.000	.152	.274
3°mes	Control	.279*	.025	.000	.218	.340

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05. Respectivamente: $p=0.021$; $p < .001$

a. Las pruebas de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos

Si hacemos comparaciones de los grupos Control de la actividad Citocromo Oxidasa con relación a los meses se observa que las diferencias de medias es significativa al nivel de $p = 0.05$, para el 1° mes presenta una significancia de $p = 0.021$, 2° mes con un $p < 0.001$ y el 3° mes con un $p < 0.001$.

Tabla 8. Estadística descriptiva al evaluar efecto sobre la enzima ATP asa

	Media	Error Estándar	Desviación Estándar	Nº
Control	57,1	0,67	2,99	20
1° Mes	64,98	0,71	3,17	20
2° Mes	67,95	0,71	3,15	20
3° Mes	69,5	0,76	3,41	20

Comparando los grupos tratados con sus respectivos grupos controles se encontró que todas las diferencias de medias con relación al control son significativas con un $p < 0.001$.

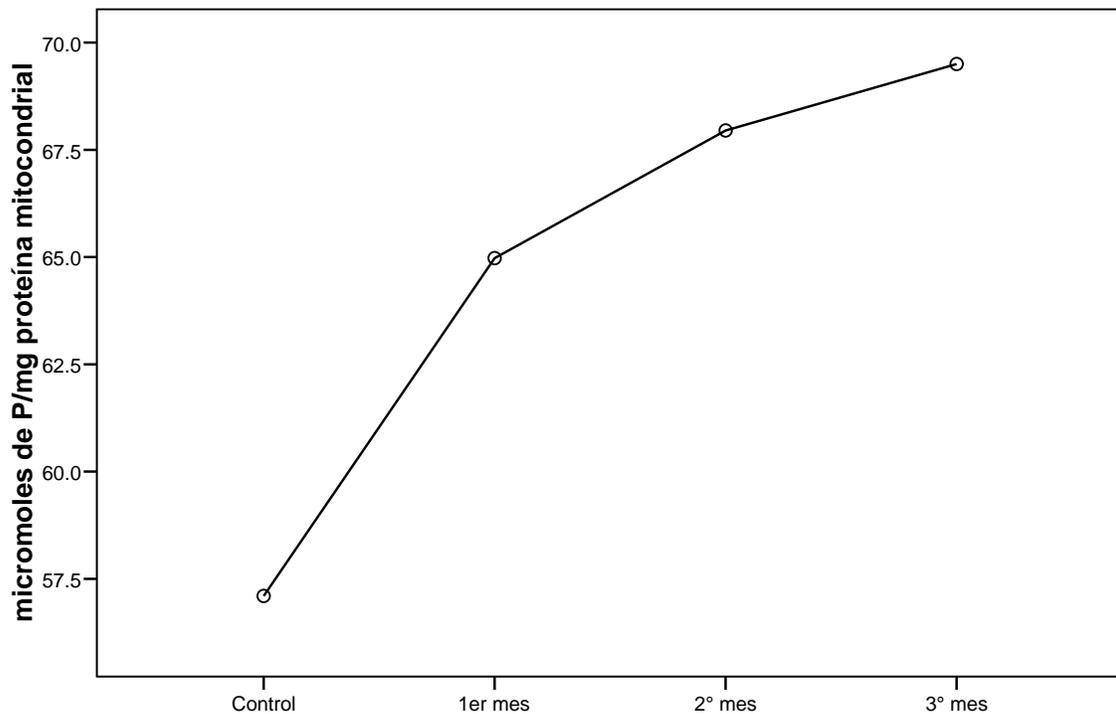


Figura 5. Valores medios de ATP

Tabla 9. Comparaciones múltiples de datos de ATPasa

	(I)gru	(J)gru	Diferencia de medias (I - J)	Error std	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
t de	1ºmes	Control	.070*	.025	.021	.009	.131
Dunnett	2ºmes	Control	.213*	.025	.000	.152	.274
(bilateral ^a)	3ºmes	Control	.279*	.025	.000	.218	.340

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Tabla 10. Nivel de transaminasas hepáticas

ENZIMAS TRANSAMINASAS

	Control		1° Mes		2° Mes		3° Mes		Significancia
	Media	Desv. std	Media	Desv. std	Media	Desv. std	Media	Desv. std	
GPT	28.33	7.20	25.06	8.16	12	2.76	30.5	4.28	0.001
GOT	35.83	3.82	25.61	9.79	12.5	1.22	37.16	8.06	0.001

GPT: Alanina amino transferasa, GOT: Aspartato amino transferasa

Se puede observar que los valores medios de Alanina aminotransferasa (GPT) van disminuyendo del 1° mes al 2° mes y al 3° mes aumenta. Igualmente sucede con los valores medios de la enzima Aspartato aminotransferasa (GOT) con respecto a los controles. (SD, desviación standard) Presentando una significancia con un $p=0.001$.

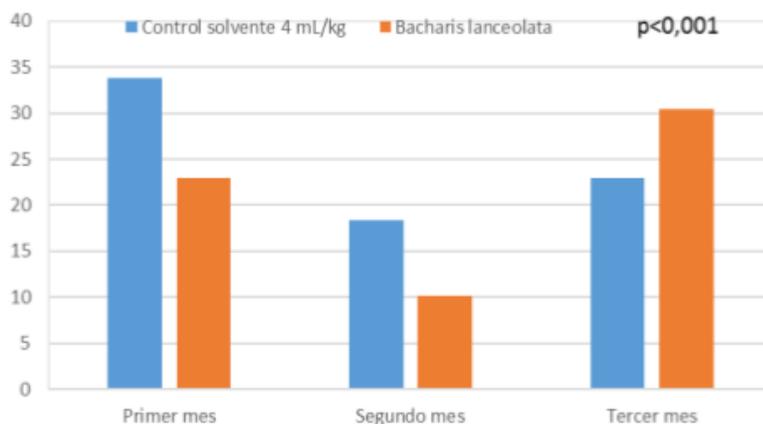
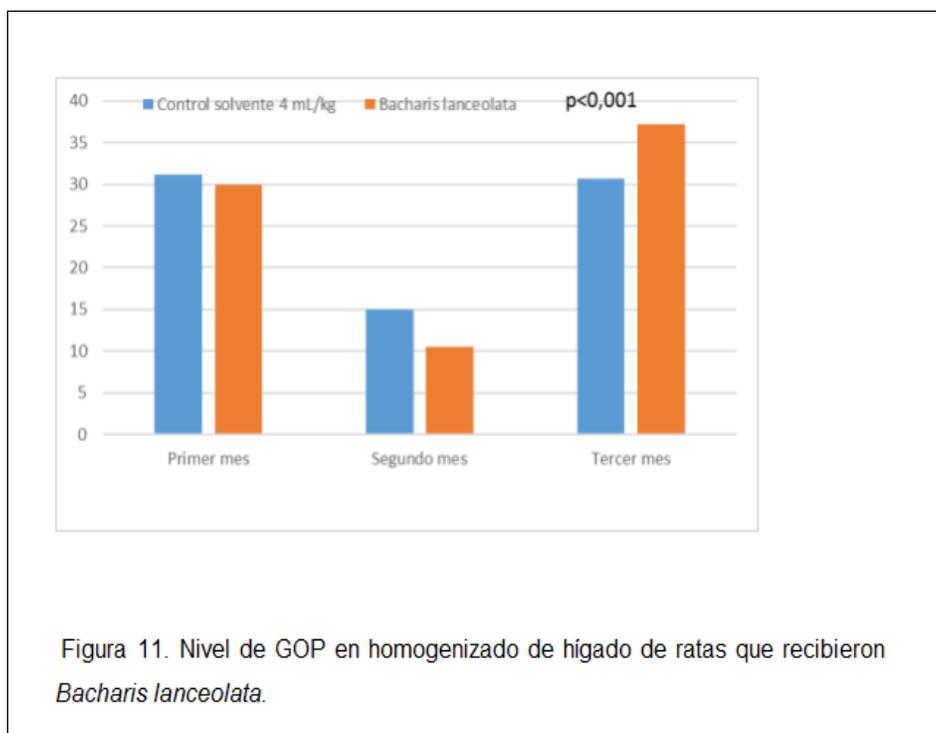


Figura 10. Nivel de GTP en homogenizado de hígado de ratas que recibieron *Bacharis lanceolata*.



4.2 Análisis, interpretación y discusión de resultados

En el presente trabajo de investigación se ha demostrado que el extracto acuoso de las hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K “chilca” podrían presentar actividad energética y hepato – protectora. El estudio ha sido realizado utilizando dosis de 14 mg/kg, la misma que fue obtenida al efectuar ensayos previos.

En el estudio se enfrentó el extracto total de chilca con las mitocondrias de hígado de rata, se encontró que la actividad respiratoria del grupo control presenta un aumento gradual y es significativo entre el 1° mes y 3° mes con un $p = 0.015$ (tabla 1, 2; figura 1) posiblemente porque los flavonoides presentes en *Baccharis lanceolata* H.B.K “chilca” permiten un acoplamiento más eficiente entre la fosforilación oxidativa con el transporte de electrones por suministro de ADP para la formación de enlaces altamente energético como ATP, que requieren las células para realizar sus funciones metabólicas, porque los flavonoides tienen la facilidad de transferir sus electrones a la cadena respiratoria (Robak, 1996).

Una forma de adquirir estas fuentes energéticas es a través de los alimentos que son proporcionados por las plantas a través de la fotosíntesis formando enlaces altamente energético que se almacenan en los tilacoides que funcionan muy similar a las mitocondrias y que en el proceso de la fosforilación oxidativa, la ATPasa que es un componente de membrana del cloroplasto, está formado por un anillo multimérico y un tallo que entra en una estructura hexámera de cabeza. El anillo gira cuando los protones atraviesan la membrana y se sintetiza ATP a partir de $ADP + Pi$ por un mecanismo de cambio de enlace. Estos enlaces altamente energéticos son utilizados por las mitocondrias del hígado, lo que permite el incremento de la velocidad de transporte de electrones y por lo tanto el consumo de oxígeno (Gonzales, 2004).

Los valores medios de la enzima ATPasa se incrementan del primer mes hasta el tercer mes con relación al control, probablemente debido a lo que hace mención Gonzales (2004). Se ha demostrado un aumento del nivel de ATP al utilizar el extracto acuoso de la planta *Baccharis lanceolata* (Tabla 8, fig.5); por otro lado el estudio fitoquímico de la planta reveló contener un alto contenido de compuestos polifenólicos como flavonoides y taninos (Whu,1999); esto estaría explicando el efecto encontrado, porque los polifenoles son compuestos fuertemente atrapadores de radicales libres, llegando a proteger la membrana celular. (Rodríguez, et al., 2006).

Se han hecho estudios de mitocondrias aisladas de hígado de ratas perfundidas con un extracto de barbatimao en la que producía estimulación del consumo de oxígeno (estado IV) y que luego inhibía la respiración en presencia de ADP y succinato produciendo la reducción de la relación ADP/O y el control respiratorio. Con el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* al administrársele a las ratas pudo haber estado sucediendo en el primer mes, debido a que inicialmente la dosis administrada probablemente habría producido cierta inhibición del control respiratorio, luego se produce una estimulación de la ATPasa a medida que fue

pasando los meses esto puede deberse a que la mitocondria tubo la capacidad de ir regulando el ingreso de compuestos fenólicos de modo que indujo una adaptación en el metabolismo de los nuevos metabolitos (Rebecca, 2003). También reportan que cuando se le suministra un exceso de dosis de extracto de barbatimao puede deteriorar el metabolismo energético en el hígado mediante tres mecanismos:

- a) Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.
- b) La inhibición del transporte de electrones mitocondriales.
- c) La inhibición de la ATPasa.

A la dosis administrada del extracto de *Baccharis lanceolata* en las ratas, la actividad respiratoria fue aumentando, esto posiblemente se debería por los flavonoides contenidos en el extracto, y ellos estarían protegiendo al hígado.

Investigaciones de la planta *Kielmeyera coriácea* indican que los extractos son ricos en xantonas, y que estos elementos químicos inhiben el metabolismo energético mitocondrial (Zagoto y Col.2006). Siendo la xantona un compuesto fenólico puede que contenga en pequeñas cantidades el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* lo cual probablemente haya producido inicialmente cierta inhibición del metabolismo energético. El 95% de oxígeno que respiramos es reducido a agua por acción de la Citocromo oxidasa-a3, último eslabón de la cadena de transporte de electrones, mediante un mecanismo en el que participan cuatro centro redox, además la principal fuente de energía (ATP) al organismo. (Valls i Belles, 2003). La Citocromo c oxidasa es una enzima que contiene Cu^{+2} y Fe^{+2} en la cadena respiratoria mitocondrial, la cual juega un rol importante en la fosforilación oxidativa debido a que el hierro incrementa significativamente la actividad de la enzima. Tal vez esto estaría produciéndose con el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* porque la actividad de la enzima aumenta.(Shetab-Boushehri et al. 2010).

En presencia de una alta concentración de sustrato, fosfato y oxígeno, la mitocondria se encuentra en un estado de metabolismo de reposo “Estado 4” por lo que la respiración es lenta, pero cuando se le adiciona ADP en determinadas

concentraciones se estimula la síntesis de ATP y se incrementa la velocidad de transporte de electrones y por lo tanto el consumo de oxígeno que es el estado metabólico activo “Estado 3”. (Gonzales, 2004) Esto puede estar ocurriendo cuando se da el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K “chilca” que contiene polifenoles y que tienen enlaces altamente energéticos que son oxidados para aportar como ADP, observándose un incremento en sus valores medios.

Referente a la actividad hepatoprotectora, se ha observado que probablemente que los polifenoles ejerzan esa acción por tiempos cortos.

Los polifenoles contenidos en el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K “chilca”, son compuestos que se forman a partir de la fenilalanina y la tirosina combinados con unidades de acetato. Su estructura química de estos compuestos fenólicos les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres. Estos compuestos se absorben bajo la forma glicosilada como los flavonoides que son transportados unidos a la albúmina hasta el hígado. En el hígado se conjugan con grupos sulfato o grupos metilos o ambos a la vez. La adición de estos grupos aumenta el tiempo de eliminación en circulación y probablemente disminuye la toxicidad. (Valls i Belles 2003). Probablemente esa disminución de los valores medios de la actividad de la alanina feniltransferasa (GPT) se deba a la acción de la quercetina al inhibir las enzimas y su capacidad antioxidante se deberían a los flavonoides los cuales se conjugan con grupos sulfatos o metilos permitiendo la desintoxicación.(Vall i Belles,2003).

El extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* al ser administrado por vía oral durante el primer mes y segundo mes ocasionó una disminución en los valores de la actividad enzimática de alanina aminotransferasa en suero de ratas ($p < 0,001$), como se aprecia en la tabla 10; figura 10 y 11, estaría en relación a una posible protección del parénquima (Tillan et al. 2009); y, luego al 3° mes hay un incremento, pero es de observarse que las variaciones de las cifras de los niveles séricos de las enzimas están dentro de los rangos permitidos (Troncoso, 2007), el incremento al tercer mes posiblemente haya sido por acumulación de otros

elementos químicos en la planta, dado que se administró en forma crónica por tres meses; el blanco también disminuyó en el 2° mes puede deberse a ciertos eventos fisiológicos de compensación que se pudieron haberse presentado.

Las transaminasas son indicadores de la función hepática, sobretodo del nivel de necrosis en los hepatocitos (Soza, 2004). El nivel normal de TGP en rata sana es de 38 U/l. En este estudio, así como en otros, los niveles de transaminasas se elevan ante la presencia de un hepatotòxico como el paracetamol. Estudios similares de intoxicación hepática con tetracloruro de carbono demuestran que se elevan los niveles de transaminasas cuando existe lesión en hepatocitos (The European Agency, 1999). Los niveles de TGP de las ratas del grupo control muestran niveles altos de transaminasas lo que evidencia daño celular en el hígado. Los resultados obtenidos demuestran que hubo disminución significativa en las concentraciones.

También las mitocondrias son productores de cierta cantidad de radicales libres que se producen en la cadena respiratoria por el transporte de electrones y probablemente los polifenoles presentes en el extracto permitan neutralizar dichos radicales. Los flavonoides son compuestos muy activos y tienen tendencia a ceder electrones y son secuestradores directos de especies reactivas de oxígeno por lo que actuaría como hepatoprotector. (Robak, 1996; Tillan y col, 2009). La presencia de taninos en el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* , actuaría como neutralizante de los radicales libres de oxígeno y por consiguiente presentarían actividad hepato- protectora. (Arroyo y Col. 2012).

Existen formas farmacéuticas sólidas como el extracto de las hojas de *Tamarindus indica* L, en la que reportan la presencia de polifenoles , flavonoides y micro elementos como el zinc, cobre y selenio que le confieren una fuerte actividad hepatoprotectora (Rodríguez Amado et.al., 2011), lo que corroboraría la acción del extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K." chilca" por contener flavonoides.

También se ha comprobado que dicho extracto de hojas de *Tamarindus indica* L, tiene efecto regenerador hepático en dosis dependiente (Rodríguez Amado et.al., 2011), puede estar sucediendo lo mismo con el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K.” chilca”.

Según Arroyo y Col.(2012), han encontrado que usando extracto y fitomedicamento a 200 mg/kg de *Piper aduncun* que contiene flavonoides y compuestos fenólicos, disminuyeron los valores de TGP(alanina fenil transferas) con un $p < 0.621$ al inducir cirrosis hepática en animales de experimentación con tetracloruro de carbono. Posiblemente el extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* por contener metabolitos secundarios semejantes tengan esa acción.

CONCLUSIONES

1. Se ha demostrado que la actividad energética representado por el control respiratorio en las mitocondrias de hígado de ratas aumenta por la administración del extracto acuoso de hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K revelándose con el mayor grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y fosforilación.
2. Se ha comprobado que por administración del extracto acuoso de hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K hubo un incremento del nivel de ATPasa en mitocondria de hígado donde se induce la síntesis de ATP en la cadena respiratoria.
3. La actividad de la enzima citocromo oxidasa en la mitocondria de hígado de rata normal ha sido aumentado por efecto de la administración del extracto acuoso de hojas de *Baccharis lanceolata* H.B.K.
4. La hepatoprotección del extracto acuoso de *Baccharis lanceolata* H.B.K ha sido evidenciada al observar variaciones de las transaminasas dentro de los valores normales en sangre de rata.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Abad, M., Bessa, A., et al.(2006). Anti-inflammatory activity of 4 Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* 103:338-344.
- 2.- Arango Acosta, G. (2010). Introducción al metabolismo secundario. Compuestos derivados del ácido shikímico. Disponible en : <http://farmacia.udea.co/-ff/shikimico.pdf>
- 3.- Arroyo, J., Almora, Y., Quino, M., Raez, E., Martinez, J., Buendia, J., Baca, D., Hañari, R. (2012). Efecto protector en cirrosis hepática inducida en ratas del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* comparado con silimarina. *An. Fac. med .v. 73 n. 2 Lima abr/jun.*
- 4.- Avalos, A., Pérez –Urría, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal* 2(3):119-145.
- 5.- Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity and relation to aging and longevity. *J. Bioenergy Biomembr.* Aug, 31 (4): 347 - 66.
- 6.- Beltran, C., Jananpa, A., Sanchez B. (2006). Determinación de la actividad antiinflamatoria de *Baccharis latifolia* R&P (chilco) UNSLG, Ica
- 7.- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1987). *Anal.Biochem*, 161:1-15.
- 8.- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., Uriarte, E., (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal. *Current Medical Chemistry* 12: 887 - 916
- 9.- Boveris, A. (1988). Regulación de la respiración mitocondrial por ADP, O₂ y NO. *Medicina (Buenos Aires)* 58: 559-560.
- 10.- Brooks, GA., Thomas, DF., (1985). *Exercise Physiology: Human Bioenergetics and its Applications*. New York: Macmillan Publishing Company. P: 443 - 469
- 11.- Burgos, N., Dorregaray, M., y Rodriguez, H. (1996). Estudio fitoquímico y bioquímico de *Piper callosum* R y P “huayusa”. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico .UNMSM.

- 12.- Bustos, L., Hernández, M., Gómez, L., Ortiz A. (2010). Protección del fruto de litchi contra el daño teratogénico inducido por ácido acetilsalicílico. SILAE. Abstract Book of XIX Congress “Fernando Cabieses Molina” ISBN: 88-8160-218-0.
- 13 .- Cámara Navarro, Y. (2005). Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. Tesis doctoral. Facultad de Biología U.B. España.
- 14.- Editor, H., García, H., Idrobo, J., et al. (1988). Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello. Tomo V.
- 15.- García H. (1992). Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica 2^{da} Edición. Tercer Mundo Editores Bogotá.
- 16.- Gonzales-Calvar, S., Coirini, H. (2004). Control respiratorio. Curvas de consumo de oxígeno. Facultad de Medicina U: B: A
- 17.- Hamana, L., Suarez, C. (2002). Patología mitocondrial en las enfermedades del miocardio. Gac. Med. Caracas v.110,n.4 p. 478-493.
- 18.- Jurupe, H., Iparraguirre, D., Pérez, E. (1995). Estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos de *Baccharis lanceolata* kunth, en animales de laboratorio. Anales de la Facultad Medicina 56(1): 10-12
- 19.- Justil, H., Arroyo, J., y Valencia, J. (2010). Extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* (carqueja) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas. An. Fac. med. , abr/ jun. Vol. 71, n° 2, p. 88 – 96. ISSN 1025 – 5583.
- 20.- Klinar, B., Castillo, R., Chang, C. (1995). Biological activity of medicinal plants of Ica (Perú). Fitoterapia 66 (4): 341-345.
- 21.- Ko Kam Ming, Hoy Yan Leung (2007). Fortalecimiento de la capacidad de generación de ATP, actividad antioxidante y actividades inmunomoduladoras de Yin y Yang tonifying hierbas. Chinese Medicine 2: 3
- 22.- Kowaltowski, AJ., de Souza – Pinto, NC., Castillo RF., Vercesi, AE. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. Free Rad Biol & Med 47: 333 – 343.
- 23 .- Kukliski, C. (2000). Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Omega Barcelona.

- 24 .- Lock de Ugaz O. (1994). Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- 25.- La Padula, P. (2010). Adaptación del miocardio de rata a la hypoxia hipobárica crónica. Actividad mecánica y mecanismos celulares. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA. Argentina.
- 26.- Martinez,F., Espinosa –García, T., Flores –Herrera, O., Pardo, J. (1993). Respiratory control induced by ATP in human term placental mitochondrial. Placenta Vol. 14, Issue 3, Mayo – June, pg. 321 – 331.
- 27 .- Melo Ruiz, V., Cuamatzi Tapia, O. (2004). Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial Reverte S.A. U. Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco México.
- 28 .- Minauro, S.; Wilken, S; García, T.(2005). Resolución de la estructura de la ATP sintasa mitocondrial dimérica por Microscopía Electrónica. Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas. Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. México.
- 29.- Monge, C; Beraud, N; Tepp,K; Pelloux, S; Chahboum,S; Kaambre,T; Kadaja,L; Roosimaa,M; Piirsoo,A; Tourneur,Y; Kutnetsov,A; Saks,V. and Seppet,E. (2009). Comparativy analysis of the bioenergetics of adult cardiomyocytes and Nonbeating HL-1 cells: Respiration chain activities, glycolytic enzyme profiles, and metabolic fluxes. Can. J. Physiol. Pharmacol. Vol:87.
- 30.- Ochoa Severo (1955). Methods in Enzimology. Edited by Colowick Sidney P. and Kaplan. New York Academic Press Inc.
- 31 .- Oyola, L., ét al. (2004). Actividad de ATPasa en Corazón de cobayos de altura. Ciencia e Investigación VII(2). Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM.
- 32 .- Oyola Hermoso, L. (1971). Mecanismo de transformación energética a nivel mitocondrial. Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica UNMSM.
- 33.- Oyola, HL (1966). Métodos de Laboratorio de Bioquímica Patológica Lima – Perú pg. 56 – 58 .

- 34 .- Palacio, V. (1992). Aporte al estudio de plantas medicinales nativas del Perú. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM.
- 35.- Pasdois, P., Parker, JE., griffiths EJ., and Halestrap,AP. (2011). The role of oxidize Cythochrome c in regulating mitochondrial reactive oxygen species production and its perturbation on ischaemia. *Biochem. J.* 436 (493 – 505) Printed in Great Britain.
- 36.- Peña Neira, A. Cambios composicionales de la baya durante el proceso de maduración y su importancia en la calidad de la uva y el vino. Disponible en : [http:// www. gie. Uchile.d/pdf/Alvaro%20Pe%F1a/Fisiología%20de%20la%20t](http://www.gie.uchile.d/pdf/Alvaro%20Pe%F1a/Fisiología%20de%20la%20t).
- 37 .- Pulman, Penesfsky; Datta, Racker. (1960). *The Journal of Biological Chemistry* 235 : 3322.
- 38.- Rasmusson, A., Geisler, D., Moller, I. (2008). The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitocondrion* Vol. 8 Issue, 1, January pages 47 – 60.
- 39.- Rebecca, MA.,Ishii - Iwamoto, EL., Kelmer – Bracht, AM., Caparroz – Assef, SM., Cuman, RK., Paradigorria, Cl., et ,al (2003). Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimao) on energy metabolism in the rat liver. *Toxicol Lett* 5; 143 (1): 55 -63.
- 40.- Reitman & Frankel.(1957). *Transaminasas. Am. J. Clin. Path.* 28 (56).
- 41 .- Robak, J., Gryglewski, R. (1996). Bioactivity of flavonoids. *Pol. J. Pharmacol.* 48(6): 555 – 564.
- 42.- Rodriguez, Amado J., Escalona Arrauz, J., Lafourcade Prada, A., Pérez Roses, R., Licea Jimenez, I. (2011). Desarrollo Tecnológico y evaluación Tóxico-farmacológica de formas farmacéuticas sólidas a partir de extractos de las hojas de la especie *Tamarindus Indica* L. *Rev. Latinoamer. Quim.* 2011,38 (Suplemento especial) Cuba.
- 43.- Rodríguez- Enríquez, S. (2005). Metabolismo energético en multiesferoides tumorales humanos. *Memorias del XIV Congreso de Bioenergética y Biomembranas Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C. México.*
- 44.- Rodríguez, J., Di Pierro, D., Gioia, M., Monaco, S., Delgado, R., Colleta, M., Marini, S. (2006). Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L, and its

active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. *Biochim Biophys Acta*. Sep; 1760(9): 1333-42.

45 .- Ruelas, C. (1985). Actividad de Succinato deshidrogenasa mitocondrial (C.E.1.3.99.1) en hígado de ratas sometidas a la acción de hormonas sexuales.

Tesis de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. UNMSM.

46.- Saura Calixto, F. et al.(2010). Dietary fiber and associated antioxidants in fruit and vegetables. In “Fruit and vegetable phytochemicals”. Willey-Blackwell Pub, Iowa, USA.Chapter 8, p 223-234.

47.- Schneider, W. C. in W. Umbreit, R. and Stauffer, J.E. (Editors) *Manometric Technique*, Burgess Publishing Company, Minneapolis. (1957). Pg 188..

48.- Seclén Santiesteban, S., Baracco Maggi, R., Mohanna Barrenechea, S. (2006). Antioxidantes en poblaciones adultas del nivel del mar y grandes alturas. Actividad de la superóxido dismutasa. *Rev Med Hered* v. 17 n.1 Lima.

49.- Soza A. (2004). Hepatitis tóxica: acetaminofen y otras. *Gastr Latinoam* ; 15 (2): 158-162

50.- Spach, P., Cunningham, C. (1987). Control of state 3 repiration in liver mitochondria from rats subjected to chronic ethanol consumption. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, volume 894, Issue 3, pages 460 – 467.

51.- Shetab-Boushehri,SV., Samavati-Sharif,MA., Ravasi, AA., Reza Kordi, M., Javadi, E., Minall, B. (2010). Effect of oral iron supplementation and endurance training on Cytochrome c oxidase activity in rat soleus muscle. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* Vol. 2, Issue 2.

52 .- Storrie, B., and Madden, E.A. (1990). *Methods Enzymol*, 182 : 214 – 215.50.

53.- Tapia Beteta, Z. (1996). Acción de la complamina sobre la ATPasa mitocondrial en hígado de cobayo. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. UNMSM.

54.- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit EMEA/MRL/548/99 – final July 1999;548(14):99.

55.- Tillan Capo, Juana; Bueno Pavón V; Carrillo Dominguez C; Agüero Fernandez S; Valdez Martinez O. (2009). Actividad hepatoprotectora del extracto acuoso

seco Boerhavia (Internet). Disponible en : www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol14_3_09/pla05309.htm

56- Troncoso LV. (2007). Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum sativum* (perejil) y de una mezcla de vitaminas antioxidantes (A,E,C) en ratas con intoxicación hepática inducida por paracetamol (Tesis doctoral) Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

57- Tyler, D., and Gonze, J. (1967). The preparation of heart mitochondrial from laboratory animal. *Methods in Enzymology X*: pg. 75.

58.- Valls i Bellés, V. (2003). El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal, Vitaminas y polifenoles. Publicaciones. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. España .-

59.- Virgili, F., Marino, M. (2008). Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* . 45(9): 1205- 16.

60.- Whu, D. (1999). Estudio Fitoquímico y Actividad Biológica de *Baccharis lanceolata*. Tesis para optar el grado de Magister en recursos Vegetales y Terapéuticos. UNMSM.

61 .- Williamson, G., Manach, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in human. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin Nutr* ; 81 (suppl): 2435-55S.

62.- Zagoto, JN., Bracht, A., Pagadigorria, CL., Ishii – Iwamoto, EL., Cortez, DA., Yamamoto, NS (2006). Effects of the *kielmeyera coriácea* extracto n energy metabolism in the rat liver. *J. Ethnopharmacol* 21; 105(1-2): 47- 54 .

63- Zampini, I.C. (2005). Potencialidades fitoterapéuticos de dos especies de *Baccharis* de la Puna de Atacama – Argentina. Universidad Nacional de Tucuman. Facultad de Bioquímica y Farmacia. Instituto de Estudios Vegetales.

Disponible en :

<http://www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/UNT/PNBA%20Zampini%202.doc>

64.- Zhao, WH; Gao, C., Zhang, YX., Tian, WX. (2007). Evaluation of the inhibitory activities of aceraceous plant on fatty acid synthase. *J. Enzyme Inhib Med Chem* Aug; 22: 501 - 10

ANEXOS

ANEXO 1: REACTIVOS

Análisis de la enzima Citocromo c Oxidasa.

- 1.- Buffer de ensayo : Tris HCl 10 mM pH 7.0, conteniendo KCl 120 mM.
- 2.- Buffer de dilución enzimática con n-dodecil β -D maltósida 1mM.
- 3.- Solución de Ditioneitol 0.1 M
- 4.- Solución de sustrato de Ferrocitocromo c (0.22 mM)
- 5.- Muestra de Enzima: Actividad enzimática 0.4 – 40 milunidades de Citocromo c oxidasa.

Análisis de la enzima ATPasa.

- 1.- Solución buffer pH 7.4
- 2.- PEP (Fosfo enol Piruvato) 0.02 M
- 3.- NADH (Nicotinamida adenin di nucleótido) 1.53 M
- 4.- LDH (Enzima láctico deshidrogenasa)
- 5.- PK (Fosfo kinasa)
- 6.- ATP (Adenosin tri fosfato) 0.1 M