

## Artículos de Originales

# EFFECTO ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD AGUDA ORAL DE LAS AGUAS TERMALES DE SAN ANTONIO DE PUTINA-PUNO

## Antioxidant effect and oral acute toxicity of thermal waters from San Antonio de Putina-Puno

José A. Llahuilla<sup>1</sup>, Pablo E. Bonilla<sup>2</sup>, Jorge L. Arroyo<sup>3</sup>, Silvia Suárez<sup>4</sup>, Francisco Armijo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Toxicología y Química Legal. <sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Facultad de Farmacia y Bioquímica. <sup>3</sup>Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina. <sup>4</sup>Centro de Investigación en Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

<sup>5</sup>Escuela Profesional de Hidrología Médica e Hidroterapia. Universidad Complutense Madrid.

### RESUMEN

Se estudiaron el efecto antioxidante y la toxicidad de las aguas termales de San Antonio de Putina-Puno, por los métodos de antiperoxidación lipídica, malondialdehído (expresado como TBARS), la toxicidad aguda oral *in vivo* a dosis fijas según la OECD 423 y la composición fisicoquímica por espectrometría de pesos con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). El efecto antioxidante presentó diferencia significativa entre el grupo control (0,0527  $\eta$ m) y el grupo estudio (0,0390  $\eta$ m) malondialdehído ( $p < 0,05$ ) y en la toxicidad aguda oral *in vivo* a dosis fijas, después del tratamiento, no se evidenciaron signos de intoxicación, además en la composición de dichas aguas termales se encontraron cloruro 71,9%, sodio 80,3% y sulfato 22,7% meq. Se concluye que las aguas termales mineromedicinales, son atóxicas, tienen efecto antioxidante y son de tipo clorurada, sulfatada y sódica.

**Palabras clave:** aguas termales mineromedicinales, peroxidación lipídica, antioxidante, toxicidad aguda.

### SUMMARY

Were studied the antioxidant effect and toxicity of the hot springs of San Antonio de Putina-Puno. Were used methods of lipid antiperoxidation, malondialdehyde (expressed as TBARS), *in vivo* oral acute toxicity at fixed dose according to 423 OECD and the physical chemistry composition by inductively coupled plasma source mass spectrometry (ICP-MS). The antioxidant effect presented significant difference between control group (0,0527  $\eta$ m) and the study group (0,0390  $\eta$ m) and malondialdehyde ( $p < 0,05$ ) and *in vivo* oral acute toxicity at fixed-dose treatment. Not evident signs of intoxication, moreover, in the composition of these hot springs were found: chloride 71,9%, sodium 80,3 % and sulphate 22,7% meq. Was concluded that the thermal mineral hot springs, are not toxic, have antioxidant effect and are chlorinated, sulphate and sodium type.

**Keywords:** thermal mineral hot springs, lipid antiperoxidation, antioxidant, acute toxicity.

### INTRODUCCIÓN

Siempre existió la predisposición del hombre por los fenómenos de la naturaleza. A veces, estos fenómenos solamente eran observados, en otras ocasiones fueron adoptados en beneficio propio. La tierra, el agua, el fuego se convirtieron en metas comunes de los pueblos de la antigüedad. Pero, a medida que los seres humanos descubrían elementos, aprendían que algunos producían bienestar y otros les perjudicaban.

En la actualidad ha tomado gran importancia el estudio de las aguas termales mineromedicinales, por ello la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1989, la Organización Mundial de Termalismo (OMTh) y las universidades con tradición en Hidrología Médica de

países como España, Portugal, Italia, Hungría, Austria, Rumanía, Turquía, Israel, Alemania, Bélgica y Francia, las establecieron como recurso a tener en cuenta en el tratamiento de diversas afecciones, para mejorar lo que se denomina "calidad de vida" <sup>(1)</sup>; a modo de ejemplo la terapéutica termal está incorporada al sistema de seguridad social en Europa, pudiendo prescribirse como cualquier tratamiento.

El Perú cuenta con más de 500 recursos termales que muy bien se pueden aprovechar y generar desarrollo turístico <sup>(2, 3)</sup>. Por otro lado, algunas enfermedades relacionadas a los radicales libres se incrementan en nuestro medio debido a que las defensas antioxidantes del organismo se ven superadas por el ataque oxidativo producto del ambiente laboral u otras condiciones que dan origen al estrés oxidativo. Dichas enfermedades se basan en la acción

tóxica del oxígeno, particularmente la de sus radicales libres (RLO) en las mitocondrias, atacan todos los principios elementales produciendo diferentes metabolitos como el malondialdehído (MDA) <sup>(4)</sup>. Existen variedad de casos de intoxicación aguda, que se manifestaron con cuadro clínico patológico, después de una sola exposición a una sustancia o múltiples exposiciones en un periodo de 24 h <sup>(5,6)</sup>.

Es por todo ello que se decidió estudiar el efecto antioxidante y toxicidad aguda de las aguas termales de San Antonio de Putina, Puno, Perú, determinando el efecto antioxidante según el método antiperoxidación lipídica, la toxicidad aguda oral según OECD 423 <sup>(7)</sup>, las concentraciones de sodio, potasio, calcio, magnesio, sulfatos, cloruros y otros correspondientes en las cuatro estaciones del año, para brindar un respaldo científico a su utilización como agua termal mineromedicinal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Toma de muestra

La investigación es de tipo experimental, analítica, prospectiva y longitudinal.

Se recolectó la muestra de agua de la fuente termal del barrio Huaynaputina del distrito de Putina, provincia de San Antonio de Putina, región Puno, ubicada a 3879 m de altitud, 14°54'51" latitud sur y 69°52'01" longitud oeste del meridiano de Greenwich.

Las muestras fueron recogidas en frascos de material polimérico, estériles, estabilizándose inmediatamente con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 63% p/p hasta pH inferior a 2, conservándose posteriormente a 4°C <sup>(8)</sup>.

Se recolectaron dos tipos de muestra para el análisis de cationes y aniones, una por cada estación del año, siendo en total 8 L. Adicionalmente, se colectó un litro para la prueba de antiperoxidación lipídica y otro litro para la prueba de toxicidad aguda oral, siguiendo los métodos de recolección descritos.

### Análisis fisicoquímico de las aguas termales

Para realizar los análisis se ha seguido principalmente las técnicas del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SM), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) y Norma US (EPA) <sup>(8,9)</sup>.

### Evaluación del efecto antioxidante

#### Técnica para detección de productos de peroxidación lipídica (TBARS)

Para dicho proceso se utilizaron los hígados de rata albina hembra, con peso de 200-220 g, mantenida

**Tabla 1.** Análisis de características físico-químicas.

| Medida            | Método               | Apartado               |
|-------------------|----------------------|------------------------|
| Temperatura       | Electrométrico       | SM 2550B               |
| Densidad          | Picnometría          | SM                     |
| pH                | Electrometría        | SM4500 H B             |
| <b>Metales</b>    |                      |                        |
| Varios metales    | ICP-MS               | EPA 200: 1994 rev.5, 4 |
| <b>No Metales</b> |                      |                        |
| Cloruros          | Cromatografía iónica | EPA 300.1993 rev. 2.1  |
| Sulfatos          | Cromatografía iónica | EPA 300.1993 rev. 2.1  |
| Sabor anís        | 0,06                 | 0,06                   |
| Sulfato ferroso   | 0,03                 | 0,03                   |

en jaula acrílica, a las que se proporcionó alimento balanceado y agua *ad libitum* dejando de alimentarlas 12 horas antes del experimento. Los animales fueron divididos en dos grupos.

A las cinco ratas del grupo control se les administraron 5 mL/kg de peso de agua apta para el consumo humano, mientras que a 15 ratas, divididas en grupos de 5 individuos, se les administró aguas termales a razón de 3, 5 y 9 mL/kg de peso, respectivamente.

Para determinar los productos de lipoperoxidación se sacrificaron los animales por dislocación cervical, seguida de perfusión del hígado con solución salina NaCl 0,9%. Luego se procedió a separar 1 g de hígado y se realizó el homogeneizado en 10 volúmenes de KCl 0,154 M, posteriormente se midió la producción del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) a 535 nm en un espectrofotómetro UV-Visible <sup>(10,11)</sup>.

### Toxicidad aguda oral por el método de dosis fija

Se emplearon ratones albinos suizos cepa Balb-C-53, machos, con peso de 28 a 32 g, procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud, mantenidos en jaula y alimentados con ratonina y agua *ad libitum*. Se les dejó de alimentar 12 h antes del experimento.

La sustancia de ensayo se administró previo ayuno de 12 a 16 horas por vía oral mediante sonda intragástrica, a dosis única de 20 mL/kg de peso corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración y los datos toxicológicos de la sustancia de ensayo.

Se dosificaron a 5 ratones para el grupo control, administrándose una dosis de 20 mL/kg de peso corporal de cloruro de sodio al 0,9 %.

El grupo estudio se conformó con 5 grupos de 5 ratones cada uno. Como se trabajó con cinco dosis diferentes: 10, 20, 30, 40 y 50 mL/kg; cada grupo recibió sólo una de ellas, respectivamente. <sup>(7)</sup>.

**Tabla 2.** Resultado de la observación a los animales de experimentación durante 14 días a dosis 20 mL/kg.

| Periodo de observación                          | Signos clínicos                                                                                                |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Media hora después de la administración         | Ligera somnolencia y agrupación al centro de la jaula                                                          |
| A partir de las 3 horas de la administración    | Signos de recuperación                                                                                         |
| A partir de las 4 horas de la administración    | Reflejo postural normal, hábitos de aseo y consumo de alimento y agua normales                                 |
| Segundo día                                     | Agrupación intermitente en los extremos de la jaula                                                            |
| Desde el tercer día, hasta el final del estudio | No se apreciaron signos de toxicidad, los animales se mostraron normales en su comportamiento y hábito de vida |

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos de las 4 horas siguientes a la administración y luego en forma diaria hasta los 14 días del ensayo experimental, en busca de signos y síntomas de toxicidad. La evaluación se dirigió a la determinación de muerte y tiempo de ocurrencia de signos y síntomas de toxicidad, incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, mucosas y ojos, en el sistema respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, en el efecto somato motor y en la conducta. Se prestó especial atención al potencial de ocurrencia de convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma. Al finalizar el periodo se sacrificó a los animales <sup>(12)</sup> y se les sometió a necropsia en la que se observaron los cambios patológicos macroscópicos de órganos y tejidos, principalmente del corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón. Posteriormente se realizó el examen histopatológico del hígado y riñón.

## RESULTADOS

Del análisis fisicoquímico de las aguas termales de Huaynaputina se encontró que el pH fue de 6,5 y la densidad 1,0. En lo referente a los análisis de cationes y aniones durante las cuatro estaciones del año, los hallazgos se describen en la figura 1.

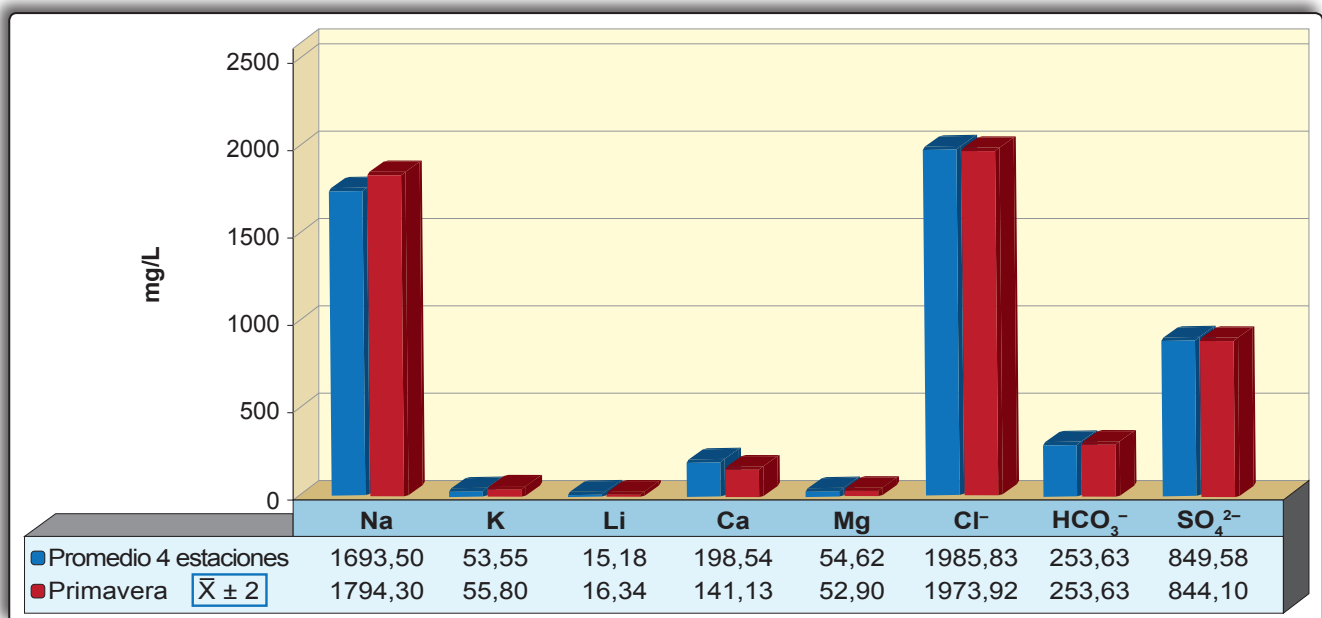
Con respecto a los resultados anatomopatológicos de los diferentes cortes histológicos, no se evidenciaron signos de intoxicación ni alteraciones estructurales.

En cuanto al efecto antioxidante, en el ensayo de peroxidación lipídica, los valores obtenidos muestran diferencia significativa entre el grupo control y el grupo estudio ( $p < 0,05$ ), como se aprecia en la figura 2.

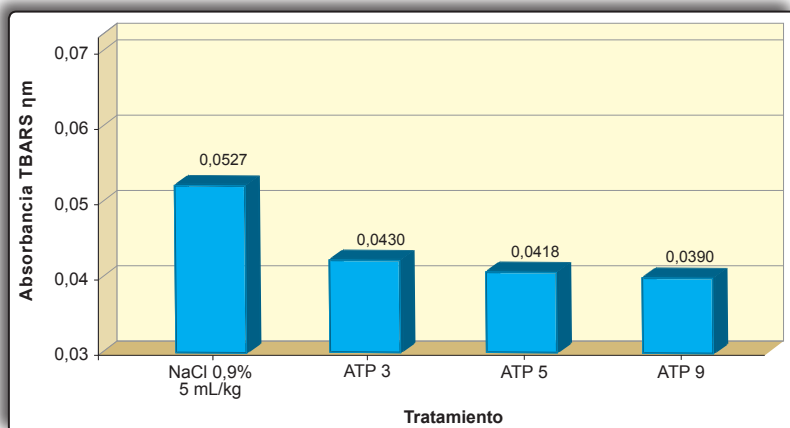
En la tabla 2 se describen los resultados de la observación a los animales de experimentación durante 14 días de ensayo.

## DISCUSIÓN

Los resultados de la determinación de cationes y aniones relacionados a las cuatro estaciones del año en las aguas termales de Putina (ATP), detallados en la figura 1, se observa que la cantidad de iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) con 1693,5 mg/L y 80,3% meq; cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) con 1985,8 mg/L y 71,9% meq; y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) con 849,5 mg/L y 22,7% meq; superan el 20% de meq del total de contenido aniónico o catiónico de las aguas termales, lo que las clasificarían como aguas sódicas, cloruradas y sulfatadas. Además, es importante observar que con



**Figura 1.** Promedio de concentración de minerales en las aguas termales de Huaynaputina en los cuatro estaciones del año.



**Figura 2.** Resultados de absorbancia de anti lipoperoxidación expresado en TBARS del grupo control con la absorbancia del grupo estudio.

respecto a las aguas cloruradas de Alceda (Cantabria), que contienen 1680,9 mg/L, las de Lanjaron (Granada) 1754,2 mg/L de cloruro, y las de Cervantes Fuente de los Baños (C. Real) 803,8 mg/L de sulfatos, todas ellas ubicadas en España <sup>(8)</sup>, las de Putina tienen mayor concentración de aniones y cationes.

La presencia de sodio al estado iónico es frecuente en todas las aguas minero medicinales. Las de Huaynaputina no son la excepción porque sus sales son muy solubles y en muchas de ellas el sodio es un elemento predominante <sup>(9)</sup>. La presencia de este elemento está condicionada a la geología y a la calidad de los terrenos, se encuentra como cloruro y sulfato lo que le da su acción protectora hepática, colagoga y purgante, y por lo tanto su importancia terapéutica.

El ion cloruro, se encuentra en proporción variable en todas las aguas minerales debido a su amplia distribución en la naturaleza; las aguas ricas en cloruros proceden de terrenos sedimentarios y en menor proporción de aguas profundas como las termales de Putina donde se encuentra como ión predominante <sup>(14, 15, 16)</sup>. Las aguas cloruradas actúan en el organismo según su concentración y mineralización asociada, pudiendo corregir la deficiencia de este ión en el organismo, además de proporcionar al agua propiedades estimulantes de la secreción gástrica, de la vitalidad celular y por consiguiente para la nutrición general. Según la OMS la concentración adecuada para aguas de bebida es de 600 mg/L, las aguas termales de Huaynaputina exceden este límite, pero son atóxicas <sup>(14)</sup>.

La presencia de sulfatos es frecuente en cantidades variables en las aguas minerales, en algunas fuentes, como las de Huaynaputina, se presenta como componente mayoritario. Este anión le confiere un sabor amargo al agua, por tanto es desagradable para

su consumo. Para aguas de bebida la OMS fija una concentración máxima admisible de 400 mg/L <sup>(17, 18)</sup>, las aguas termales de Huaynaputina exceden este límite.

En primavera se incrementan las concentraciones de sodio, cloruro y sulfato (figura 1). Lo cual probablemente ocurra por los movimientos telúricos o degradación de la roca madre.

La temperatura de las aguas termales llegó hasta 48,9°C, lo que es mayor al promedio anual de la temperatura ambiental de la zona. Esto las clasifica como aguas hipertermales.

Las temperaturas altas son de gran interés terapéutico por la acción térmica sobre el organismo <sup>(8)</sup>. Debido a la presencia de volcanes en la región Puno, se podría afirmar que las fuentes de Huaynaputina son de origen volcánico y que deben a ello sus temperaturas).

El pH 6,5, ligeramente ácido, de la fuente termal se debe principalmente a la presencia de CO<sub>2</sub> y aniones ácidos <sup>(9, 14)</sup>. Las aguas de bebida, según la OMS y la Ley General de Aguas deben tener pH entre 6,5 - 9,2, lo cual deja dentro del rango a las procedentes de la fuente en estudio. El olor a huevo podrido que se percibe en ella, se debe probablemente a la presencia de sulfuros y gases que se emanan a temperaturas altas como H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>, SO. El sabor salado que predominante sería por la presencia de cloruro de sodio, el sabor metálico por la presencia de hierro, manganeso, calcio y el sabor amargo por la de sulfato. La densidad de las aguas estudiadas depende del grado de mineralización y por tanto, de la estación del año <sup>(16, 18, 20)</sup>.

En la tabla 2, se observa que sólo media hora después de la administración de la dosis 20 mL/kg los animales presentaron signos clínicos, ligera somnolencia y agrupación al centro de la jaula; posteriormente se apreciaron signos de recuperación, reflejo postural normal, hábitos de aseo y consumo de alimento y agua normales hasta el día 14.

Por otro lado, los cortes histológicos de los diferentes órganos (hígado, riñón, corazón) del ratón, presentaron alteraciones propias de los agentes extraños, que al ingresar al organismo modifican la fisiología celular, así se observó micro vascularización en hepatocitos, conductos biliares alterados, y glomerulonefritis en menor cantidad, mientras que el corazón se mantuvo normal. Estas alteraciones se regeneran, lo cual indica que no necesariamente

producen daño permanente a la dosis administrada, por ello sería conveniente la realización de nuevos estudios que evalúen la toxicidad crónica.

En la figura 2 se observa que existe diferencia significativa entre los resultados del grupo control (NaCl 0,9% 5 mL/kg de peso) y los de los grupos estudio (aguas termales 3, 5 y 9 mL/kg de peso, respectivamente), evidenciándose que existe una relación inversamente proporcional entre la dosis administrada y la lectura de absorbancia alcanzada (peroxidación lipídica)<sup>(10)</sup>. Esto demuestra la actividad antioxidante de las aguas estudiadas.

## CONCLUSIONES

- Las aguas termales de Huaynaputina, demostraron tener efecto antioxidante por la prueba de peroxidación lipídica y no presentan toxicidad a dosis de 20 mL/kg.
- Las concentraciones mayoritarias de cationes y aniones en las cuatro estaciones del año son: sodio 1693,50; potasio 53,55; calcio 198,54; magnesio 54,62; sulfato 849,58 y cloruro 1985,83 mg/L.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gibert F. Termalismo en Argentina. Guía Terpesolud. Bisesemanario El Fedérense. Córdoba, 2010. [En línea]. Acceso 29 de junio 2012. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/termalismo\\_en\\_argentina.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-bal/termalismo_en_argentina.pdf)
- Destino Perú. Tribuna termal. [En línea]. Acceso 26 de setiembre 2012. Disponible en: <http://www.tribunatermal.com>
- Perú termal. [En línea]. Acceso 09 de setiembre del 2014. Disponible en: <http://perutermal.blogspot.com/>
- Cuenca, Ramón J, Gimenez A, Torres A. Influencia de crenoterapia con aguas bicarbonatadas sulfatadas en el estrés oxidativo de una población balnearia Madrid. [Tesis Doctoral]. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2003.
- Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4<sup>ta</sup> ed. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, 2009.
- Córdoba D. Toxicología. 5<sup>ta</sup> ed. Editorial Manual Moderno. Bogotá, 2006.
- OECD/OCDE. Guideline for testing of chemicals. Acute oral toxicity – fixed dose procedure. N° 420. 2011. [En línea]. Acceso 13 de Junio 2013. Disponible en: [http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced\\_gl420.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl420.pdf)
- Maraver F, Armijo F. Vademécum II de aguas mineromedicinales españolas. 2<sup>da</sup> ed. Editorial Complutense. Madrid, 2010.
- Yupanqui Torres. Análisis fisicoquímico de fuentes de aguas termo minerales del Callejón de Huaylas [Tesis para optar el grado de Magíster]. Facultad de Química, Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, 2006.
- Ramón JR, Hernández A, Cuenca E, Casado A, López E, Polo MM. La eliminación urinaria de productos de lipoperoxidación depende de un ritmo biológico anual. Rev Esp Geriatr Gerontol 2006; 41(5): 285-8. [En línea]. Acceso 20 de noviembre 2010. Disponible en: <http://zl.elsevier.es/es/revista/revista-espanola-geriatria-gerontologia-124/sumario/vol-41-num-05-13004001>
- Harris D. Análisis químico cuantitativo, espectroscopia atómica. 2<sup>da</sup> ed. Reverte. Barcelona, 2001. Tomo I, p. 603-12.
- Bryony Close, *et al.* Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: Parte 2. [En línea]. Acceso 10 de setiembre 2012. Disponible en: <http://sea.umh.es/files/2011/07/eutanasia2.pdf>
- Wolf R. What is ICP\_MS? ... and more importantly, what can it do?. 2005. [En línea]. Acceso 08 de noviembre 2012. Disponible en: [http://minerals.cr.usgs.gov/icpms/What\\_is\\_ICPMS.pdf](http://minerals.cr.usgs.gov/icpms/What_is_ICPMS.pdf)
- Huamaní A. Aguas termales y minerales en el suroriente del Perú (Dptos. de Apurímac, Cuzco, Madre de Dios y Puno). Boletín N° 24, serie D: Estudios regionales. Proyecto Riesgo volcánico e hidrotermalismo en el Perú. INGEMMET. Lima, 2001.
- Raimondi A. El Perú. Estudios mineralógicos y geológicos. Tomo IV. Sociedad Geográfica de Lima. 1902, p. 357.
- Raimondi A. Minerales del Perú: descripción mineralógica detallada de 1617 muestras de la república. Tomo II. Supremo Gobierno del Perú. Lima, 1939. p. 573.
- Hernández A, Ramón J, Cuenca E, Márquez J. Acción antioxidante de la crenoterapia con aguas sulfuradas y peloides sobre el organismo humano, en relación con la edad. Rev Esp Geriatr Gerontol 1999; 34 (4): 215-23.
- Guevara A. Control de calidad del agua. Análisis de las normas de control de la calidad de las aguas. OMS/OPS. Lima, 2006. [En línea]. Acceso 07 de abril 2013. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/scan2/031275/031275.pdf>
- Bruton L, Chabner B. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12<sup>va</sup> ed. McGraw-Hill Interamericana. 2012.
- Storch KV. Quality standard for medical spas and medical wellness-providers in Europe. European Spas Association. Schweizerbat Science Publishers. 2012.

Manuscrito recibido el: 26/05/14

Aceptado para su publicación el: 06/10/14

## Correspondencia:

Nombre: José Antonio Llahuilla Quea  
 Direccion: Jr. Puno 1002 – Lima 01  
 Email: josellahuillaquea@gmail.com