

Estudio fitoquímico de *Plukenetia volubilis* L. y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. albinus

Phytochemical screening of Plukenetia volubilis L. and its antioxidant effects of the Fe³⁺/ascorbate stimulated lipid peroxidation in hepatic of Rattus rattus var. albinus

CASTILLO SAAVEDRA, Ericson Felix¹; CASTILLO VIERA, Segundo Felix²; REYES ALFARO, Cecilia Elizabeth³

RESUMEN

El presente estudio se realizó para determinar los metabolitos secundarios presentes en *Plukenetia volubilis* L., y al mismo tiempo analizar su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en homogenizado de hígado de *Rattus rattus* var. albinus. El análisis fitoquímico fue realizado mediante la técnica de Olga Lock, con la finalidad de determinar cualitativamente los metabolitos secundarios por medio de las reacciones de coloración y precipitación. El efecto antioxidante in vitro se realizó del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico, midiendo el malonaldehído (MDA) formado, con el propósito de determinar la peroxidación lipídica en un homogenizado de tejido hepático de *Rattus rattus* var. albinus in vitro. Al realizar la prueba estadística "t" de datos apareados arrojó como resultado una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) tanto para la dosis mínima (70 mg/mL) como para la dosis máxima (140 mg/mL), pero cuando fueron analizados ambos grupos en tratamiento no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$). El análisis fitoquímico del extracto etanólico reveló la presencia de taninos, flavonoides, esteroides y alcaloides. El presente estudio ha demostrado el efecto antioxidante in vitro del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L.

Palabras clave: *Plukenetia volubilis* L., efecto antioxidante, peroxidación lipídica, análisis fitoquímico.

ABSTRACT

This study was carried to determined secondary metabolites of *Plukenetia volubilis* L. and analyze its antioxidant effects of the Fe³⁺/ascorbate stimulated lipid peroxidation in hepatic tissue of *Rattus rattus* var. albinus. Phytochemical screening was realized using Olga Lock technique, taking place the qualitative determination of the secondary metabolites by means of the coloration reactions and precipitation. Ethanol extract of *Plukenetia volubilis* L. was screened for in- vitro antioxidant activity using thiobarbituric acid, measuring the produced malonaldehyde (MDA) to determinate lipid peroxidation in hepatic tissue homogenates in-vitro. Higher difference significant ($p < 0,001$) was encountered with the minimum dosage (70 mg/mL) and maximum dosage (140 mg/mL) when was realized the matched dates "t" test, but there wasn't significant difference ($p > 0,05$) when the minimum dosage and maximum dosage were analyzed. Ethanol extract showed presence of tannins, flavonoids, steroids, alkaloids and saponins on phytochemical screening. We demonstrated antioxidant activity of ethanol extract of *Plukenetia volubilis* L. in-vitro.

Key words: *Plukenetia volubilis* L., antioxidant effect, lipid peroxidation, phytochemical screening.

¹ Magíster en Farmacia y Bioquímica. Docente de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Trujillo, Perú. ericson_fcs@hotmail.com

² Doctor en Ciencias Biológicas. Docente de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. felix_cviera@hotmail.com

³ Especialista en Cuidado del Adulto en Centro Quirúrgico. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. cece_taurus@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Las propiedades curativas de las plantas se deben a que contienen sustancias y principios activos específicos aparte del contenido químico que es común a todos los vegetales: almidones y celulosa. Los principios activos están referidos a sustancias químicas de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida que los llamados metabolitos primarios y que participan en la actividad celular de todo ser vivo¹.

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas, polifenoles de alto peso molecular que se caracterizan por formar complejos estables con las proteínas. Se encuentran divididos en 3 grandes grupos: taninos hidrolizables, condensados y complejos². Se ha informado el estudio de los taninos como antivirales, antioxidantes, cicatrizantes, antimicrobianos e inhibidores de proteasas^{1,2}.

Los flavonoides, también conocidos como antoxantinas constituyen un grupo extenso de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos y comunes en todo el reino vegetal, particularmente en las partes aéreas; demostrándose en algunos estudios realizados el efecto hepatoprotector de los flavonoides frente al daño causado por sustancias oxidativas como el tetracloruro de carbono (CCl₄)^{3,4,5}.

Las cumarinas, se presentan a menudo como mezcla, en forma libre y como glicósidos, tienen amplio rango de actividad biológica, con acción anticoagulante, antibacteriana, hepatotoxicidad y carcinogenicidad, acción insecticida, uso como saborizante y en perfumería^{1,6}.

Los esteroides, mucho se encuentran como glicósidos formando las llamadas saponinas triterpenoides y esferoidales, estos compuestos tienen como principal actividad ser antiinflamatorios¹.

Los alcaloides, constituye el grupo más grande de metabolitos secundarios que pueden encontrarse al estado libre, como glicósidos o formando sales con ácidos; su acción fisiológica es variada como antiespasmódica, analgésica, estimulante y expectorante^{1,5}.

Todos los seres vivos aeróbicos, es decir, que utilizan el oxígeno para la generación de energía, liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estos radicales^{7,8}.

Los antioxidantes son sustancias químicas que encontrándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula), se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, en el cual puede provocar alteraciones fisiológicas importantes

desencadenantes de diversas enfermedades^{9,10,11}.

El efecto que producen los radicales libres es neutralizado por los antioxidantes, que ayudan a prevenir la acción de los radicales libres transformándolos en compuestos más simples e inofensivos¹¹.

Plukenetia volubilis L., "sacha inchi", es una euphorbiaceae que comúnmente se conoce como "maní del monte", "sacha maní" o "maní del inca". Se encuentra distribuida desde América Central y en el Perú se le encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín (Tarapoto), Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. Es una planta que se adapta a suelos arcillosos y ácidos, y se desarrolla mejor en climas cálidos^{12,13,14}.

El sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.), una leguminosa aún de escasa importancia como cultivo industrial, ofrece grandes perspectivas de uso, pues contiene 23 % de proteína y 49.9 % de aceite, además aminoácidos esenciales y ácidos grasos insaturados. Dentro de sus componentes de *Plukenetia volubilis* L. se encuentran principalmente: proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales (omegas 3, 6, y 9) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) en contenidos significativamente elevados, respecto de semillas de otras oleaginosas (maní, palma, soya, maíz, colza y girasol). Investigaciones recientes realizadas con aceites omega y vitamina E indican la importancia nutricional y terapéutica de su consumo para el control de radicales libres y una serie de enfermedades que estos originan en el organismo humano. Sacha inchi constituye un cultivo nativo con posibilidades de industrialización y con un probable potencial de rendimiento económico^{13,14,15,16,17}.

Por lo anteriormente expuesto y teniendo conocimiento del uso empírico, bajo costo y fácil adquisición de *Plukenetia volubilis* L. para el tratamiento de diversas patologías, y al no existir trabajos científicos en nuestro medio sobre la composición de sus fitoconstituyentes y que corroboren los posibles efectos antioxidantes de esta especie vegetal, surgió el interés de investigar si *Plukenetia volubilis* L. presenta efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. albinus, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

Identificar los fitoconstituyentes de la especie *Plukenetia volubilis* L. mediante la marcha fitoquímica de Olga Lock.

Determinar el efecto antioxidante de *Plukenetia volubilis* L. en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. albinus.

MATERIAL Y MÉTODO

1. Material de estudio

Material Botánico: Se emplearon las hojas de *Plukenetia volubilis* L., recolectadas en la ciudad de Tarapoto durante los meses de marzo a mayo e identificadas en el Herbarium Truxillensis (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo.

Animales de Experimentación: Se emplearon 19 especímenes de *Rattus rattus* var. *albinus*, de tres meses de edad, de ambos sexos, cuyos pesos oscilaron entre 200 y 220 g en aparente buen estado de salud, alimentados con una mezcla de maíz y purina, más agua ad-libitum. De ellas se extrajo el hígado para la realización del experimento¹⁸.

2. Métodos

Estudio fitoquímico: Se basó en la extracción de los fitoconstituyentes, con el empleo sucesivo de diferentes solventes apropiados, siguiendo como procedimiento la marcha fitoquímica preliminar de Lock, O.¹⁹.

Estudio farmacológico

a. Obtención del extracto hidroalcohólico

Las hojas de *Plukenetia volubilis* L., fueron desengrasadas con hexano, y se realizó la extracción con una mezcla de 50% de etanol 70°C + 50% de agua, utilizando el método de reflujo por un periodo de 3 horas consecutivas. El extracto obtenido se evaporó por calentamiento y se procedió a guardarlo en refrigeración hasta el momento de su utilización. Para el estudio farmacológico se reconstituyó el extracto seco con agua destilada. Se realizó una prueba piloto para la determinación de la dosis mínima (70 mg/mL) y dosis máxima (140 mg/mL) del extracto de la droga vegetal¹⁸.

b. Obtención del homogenizado de hígado

Se realizó la decapitación de las *Rattus rattus* var. *albinus*, para realizar la extracción del hígado con solución de Krebs al frío; para luego homogenizarlo con 5 volúmenes de solución de Krebs. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm a 4°C, y con el sobrenadante obtenido se realizó los ensayos de peroxidación lipídica^{6,19}.

c. Peroxidación lipídica^{6, 18, 21}

La peroxidación lipídica fue medida utilizando el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual consiste en hacer reaccionar el malonaldehído (MDA) incoloro generado por la peroxidación

lipídica con el TBARS, para ser leído en el espectrofotómetro a 535 nm en presencia y ausencia de Fe³⁺/ascorbato y del extracto hidroalcohólico de *Plukenetia volubilis* L.

d. Distribución de los especímenes¹⁸

Se utilizaron 19 animales de experimentación cuyos hígados fueron procesados en 3 grupos de trabajo:

Grupo problema 1: El homogenizado hepático extraído de *Rattus rattus* var. *albinus* fue tratado con 0.2 mL de extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. a la dosis de 140 mg/mL, 0.1 mL de hierro y 0.2 mL de ascorbato.

Grupo problema 2: El homogenizado hepático extraído de *Rattus rattus* var. *albinus* fue tratado con 0.2 mL extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. a la dosis de 70 mg/mL, 0.1 mL de hierro y 0.2 mL de ascorbato.

Grupo control: El homogenizado hepático extraído de *Rattus rattus* var. *albinus* fue tratado con 0.1 mL de hierro y 0.2 mL de ascorbato.

e. Obtención de dosis efectiva (DE) 100

En un estudio piloto experimental se obtuvo la dosis efectiva 100 (DE100) del extracto hidroalcohólico de *Plukenetia volubilis* L., el mismo que fue utilizado en el diseño experimental. Este dato fue obtenido de graficar la concentración de MDA con la concentración del extracto hidroalcohólico, se tomó como parámetro el punto más cercano al eje de las X, el cual significó la dosis a la cual se ha producido el mayor efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Plukenetia volubilis* L.¹⁸.

f. Análisis Estadístico

Para determinar la significancia estadística entre los grupos problema y el control se aplicó la prueba estadística "t" de datos apareados con un nivel de significancia de 0.05, para lo cual se realizó una curva patrón de MDA a partir de las lecturas realizadas en el espectrofotómetro con concentraciones conocidas de MDA y se comparó con la curva obtenida al graficar la concentración de MDA generado por la peroxidación lipídica del hígado extraído de *Rattus rattus* var. *albinus* con la concentración del extracto hidroalcohólico de *Plukenetia volubilis* L. La variabilidad interindividual de los efectos en los grupos problema fue analizada con el Análisis de Varianzas¹⁸.

RESULTADOS

A partir de las coloraciones, precipitaciones y cuantificaciones que se realizaron en el presente trabajo que se resumen en los siguientes cuadros:

En las tablas 1, 2 y 3, se presentan los metabolitos secundarios encontrados en hojas de *Plukenetia volubilis* L., mediante la marcha fitoquímica preliminar de Olga Lock.

En la tabla 4, se presenta el espectro de absorción ultravioleta (UV) realizado en los flavonoides hidrolizados de las hojas de *Plukenetia volubilis* L.

En la tabla 5, se presentan las concentraciones de MDA en la lipoperoxidación inducida con Fe^{3+} /ascorbato a las concentraciones de 7mg/mL y 14 mg/mL del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L., en homogenizado hepático de *Rattus*

rattus var. *albinus*.

En la tabla 6, se presenta los valores promedio de MDA producido por la lipoperoxidación en hígado de *Rattus rattus* var. *albinus* según grupo de trabajo.

En la tabla 7, se presenta la diferencia de medias de MDA producido por la lipoperoxidación en hígado de *Rattus rattus* var. *albinus* según grupo de trabajo experimental (dosis mínima y dosis máxima), utilizando como prueba estadística "t" de datos apareados.

En las tablas 8, 9 y 10, se presentan la comparación de dosis mínima, dosis máxima y control para poder determinar diferencia significativa entre ambos grupos de tratamiento.

Tabla 1. Identificación de fitoconstituyentes según la marcha fitoquímica preliminar de Olga Lock en hojas de *Plukenetia volubilis* L.

Reacciones de coloración y/o precipitación		Extracto			
		Etanólico	Clorofórmico	Cloroformo - etanólico	Acuoso remanente
Taninos	Ensayo de gelatina	+	X	X	X
	Reacción con tricloruro férrico	++	X	X	++
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+	X	-	++
Esteroides	Reacción Lieberman - Bouchard	X	-	-	X
Aminoácidos	Reacción de Ninhidrina	-	X	X	X
Quinonas	Reacción de Bortranger	X	X	X	X
Leucoantocianidinas	Reacción de Rosenheim	X	X	-	++
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	X	-	-	X
	Reacción de Mayer	X	-	-	X
	Reacción de Hager	X	-	-	X

Tamaño de partícula: 1.2 mm

Leyenda:

- ++ : Abundante precipitado o color intenso
 - : No hay cambio
 + : Mínimo precipitado o color
 X : No se desarrollo la reacción

Tabla 2. Fitoconstituyentes determinados en la fracción insoluble en las hojas y tallos de *Plukenetia volubilis* L. según la marcha fitoquímica preliminar de Olga Lock.

Fitoconstituyentes	Fracción insoluble
	Resultados
Taninos	X
Flavonoides	X
Esteroides	++
Aminoácidos	X
Quinonas	-
Leucoantocianidinas	X
Alcaloides	X

Leyenda:

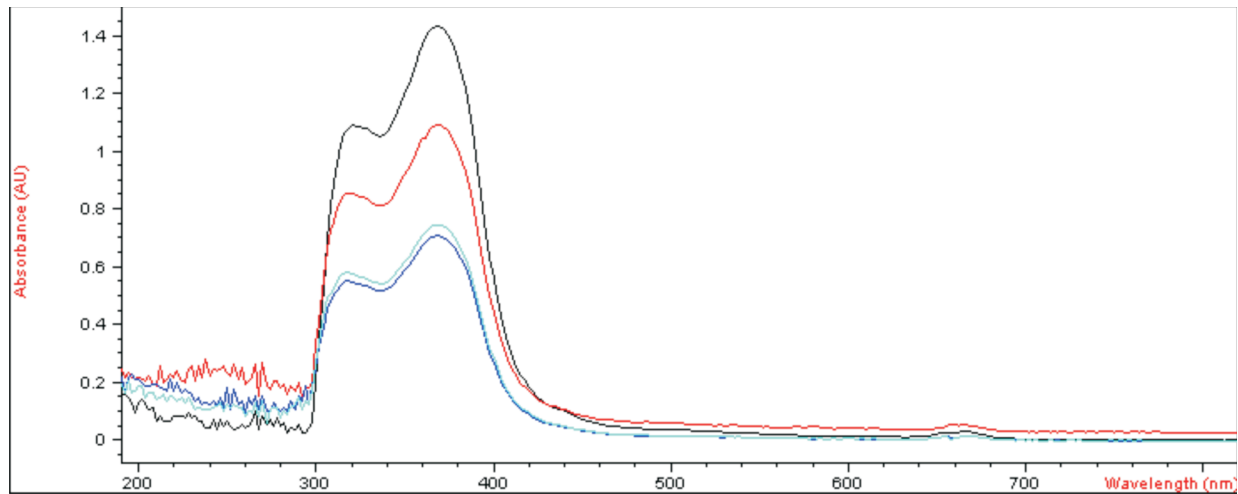
- ++ : Abundante precipitado o color intenso. - : No hay cambio
 + : Mínimo precipitado o color. x : No se desarrolló la reacción

Tabla 3. Fitoconstituyentes determinados en las hojas de *Plukenetia volubilis* L. según la marcha fitoquímica preliminar de Olga Lock.

Fitoconstituyentes	Resultados
Taninos	+
Flavonoides	+
Esteroides	+
Aminoácidos	-
Quinonas	-
Leucoantocianidinas	-
Alcaloides	+
Saponinas	+

Leyenda:

+ : Positivo - : Negativo

Figura 1. Espectro de absorción realizado en el ultravioleta (UV) de flavonoides hidrolizados en las hojas de *Plukenetia volubilis* L.

Número	Absorbancia [368 nm]
1	1,43240
2	1,08970
3	0,70544
4	0,74313

Tabla 5. Concentración de malondialdehído en la lipoperoxidación inducida con Fe³⁺/ascorbato a las concentraciones de 7mg/mL y 14 mg/mL del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L., en homogenizado hepático de *Rattus rattus* var. albinus.

Número de espécimen	[Malondialdehído en ug/mL]		
	Control	Problema 1 [<i>Plukenetia volubilis</i> L.: 70 mg/mL]	Problema 2 [<i>Plukenetia volubilis</i> L.: 140 mg/mL]
01	71,5	41,0	41,0
02	58,0	50,0	41,0
03	50,0	41,0	41,0
04	54,0	50,0	37,0
05	41,0	41,0	32,5
06	41,0	37,0	28,5
07	58,0	32,5	39,0
08	80,0	28,5	75,5
09	80,0	50,0	50,0
10	54,0	31,0	24,0
11	54,0	32,5	22,0
12	67,0	37,0	45,5
13	67,0	24,0	32,5
14	81,5	31,0	26,0
15	81,5	26,0	24,0
16	96,0	67,0	92,0
17	71,5	54,0	41,0
18	100,0	32,5	58,0
19	100,0	32,5	28,5
Rango mínimo	41,0	24,0	22,0
Rango máximo	100,0	67,0	92,0
Promedio	68,7368	38,8684	41,0000

Tabla 6. Valores promedio de malondialdehído (MDA) producido por la lipoperoxidación en hígado de *Rattus rattus* var. albinus según grupo de trabajo.

Grupos	n	Promedio (ug)	Desviación estándar (ug)
Dosis mínima	19	38,8684	11,04
Dosis máxima	19	41,0000	17,99
Control	19	68,7368	18,36

Leyenda:

Dosis mínima: 70 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.

Dosis máxima : 140 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.

Tabla 7. Diferencia de medias de malondialdehído (MDA) producido por la lipoperoxidación en hígado de *Rattus rattus* var. albinus según grupo de trabajo experimental (dosis mínima y dosis máxima), utilizando como prueba estadística "t" de datos apareados.

Grupos	Promedio (ug)	Desviación estándar (ug)	"t"	P
Dosis mínima	38,8684	11,04	15,350	<0.001
Dosis máxima	41,0000	17,99	9,937	<0.001

Leyenda:

Dosis mínima: 70 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.

Dosis máxima: 140 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.

Tabla 8. Comparación de dosis mínima y dosis máxima para poder determinar diferencia significativa entre ambos grupos de tratamiento.

Grupos	"t"	P
Dosis mínima vs Dosis máxima	- 0,440	>0,05

Leyenda:

Dosis mínima: 70 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.Dosis máxima: 140 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.**Tabla 9. Comparación de dosis mínima y control para poder determinar diferencia significativa entre ambos grupos de tratamiento.**

Grupos	"t"	P
Dosis mínima vs Control	- 6,076	<0,001

Leyenda:

Dosis mínima: 70 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.**Tabla 10. Comparación de dosis máxima y control para poder determinar diferencia significativa entre ambos grupos de tratamiento.**

GRUPOS	"t"	P
Dosis máxima vs Control	- 4,703	<0,001

Leyenda:

Dosis máxima: 140 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L.

DISCUSIÓN

A escala mundial, los preparados fitoterapéuticos obtenidos a partir de drogas de origen vegetal, ocupan un lugar muy importante dentro del comercio de medicamentos, y debido a ello, se ha enfatizado en la necesidad de investigar los constituyentes químicos de las drogas vegetales, y sus posibles acciones terapéuticas^{22, 23, 24}.

En la tabla 1, podemos observar los fitoconstituyentes determinados en la fracción soluble según la marcha fitoquímica de Olga Lock por medio de reacciones de coloración y precipitación realizadas en *Plukenetia volubilis* L. La reacción con tricloruro férrico fue positiva, dando una coloración azul negruzca; esta reacción determinó la presencia de compuestos fenólicos, refiriéndose a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, los cuales se encuentran frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar^{19, 22}.

La reacción más usual para la detección de flavonoides es la reacción de Shinoda, la cual fue positiva, observándose un color rojo. En dicha reacción, el magnesio metálico fue oxidado por el ácido clorhídrico (HCl) concentrado, dando como productos el H₂, que fue eliminado en forma de gas

y el MgCl₂, que formó complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente, actuó sobre el grupo carbonilo de la flavona, produciendo una coloración roja, éste aumento de intensidad se debió a que el magnesio divalente intensificó la coloración por estar doblemente coordinado^{23, 24}.

En la reacción de Liebermann - Burchard, el resultado positivo se evidenció por la aparición de un color azul verdoso, lo cual indicó la presencia de esteroides, la reacción fue realizada en medio absolutamente anhidro, ya que al existir moléculas de agua presentes, éstas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la reacción con el núcleo esteroidal. El cloroformo, solubilizó a la muestra favoreciendo la captación de algunas moléculas de agua presentes, y el ácido sulfúrico, favoreció la deficiencia electrónica del anhídrido acético, el cual fue estabilizado por los electrones de los dobles enlaces (dieno) conjugados, observándose la coloración respectiva^{21, 25}. En el presente estudio se consiguió una gama de colores transitorios pasando por el rojo púrpura y el azul, hasta que el color se estabilizó en verde azulado por cierto tiempo y después de unas horas desapareció para dar una

coloración amarilla intensa, indicándonos resultado positivo²⁵.

En las reacciones de identificación de alcaloides, se trabajó con las reacciones de Mayer, Dragendorff y Hager, éstas produjeron con las sales de los alcaloides precipitados coloreados, que se confirmaron al adicionar etanol.

La reacción de Mayer, fue positiva al realizar el análisis fitoquímico, lo cual demostró que esta reacción presenta como metal de coordinación al mercurio (Hg²⁺), formando una coordinación tetraédrica, evidenciándose por una coloración blanco cremosa¹⁹.

La reacción de Dragendorff, fue positiva luego del análisis correspondiente, esta reacción fue producida con las sales de los alcaloides precipitados coloreados; el bismuto presenta una geometría octaédrica, donde su par de electrones libres, ocupan una posición, y las otras 5 posiciones son ocupadas por 1-, originando de esta manera una carga formal de 2- donde puede interactuar con dos moléculas de alcaloide, evidenciándose por una coloración anaranjada^{19, 23, 25}.

La reacción de Hager, presentó como reactivo clave el ácido pícrico que actuó como tal frente al alcaloide; por otro lado el anillo del ácido pícrico se encontró con deficiencia electrónica, que fue compensado por el anillo del grupo metóxi del alcaloide, el cual se encontraba ávido de electrones, produciéndose de esta manera un complejo sigma dando como resultado cristales amarillos, evidenciándose al realizar el análisis fitoquímico de *Plukenetia volubilis L.*^{19, 25}.

Respecto a las saponinas, el presente informe arrojó un resultado positivo, siendo la prueba de la espuma la más específica; evidenciándose por la formación de una espuma persistente, por un tiempo mínimo de 30 minutos.

Las saponinas son un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta, por lo tanto al agitar sus soluciones se formó una espuma abundante y relativamente estable, por ser tensioactivos^{19, 23, 24}.

La tabla 2, nos indica los fitoconstituyentes determinados en la fracción insoluble en las hojas de *Plukenetia volubilis L.* según la marcha fitoquímica de Olga Lock, observándose que el solvente orgánico (hexano) produjo una reducción de las interacciones moleculares en los grupos funcionales presentes en los metabolitos secundarios existentes en las hojas de *Plukenetia volubilis L.*, por este motivo en la fracción insoluble solo se encontraron esteroides^{19, 22, 23}.

Finalmente, en los cuadros 1 y 2, los metabolitos secundarios o principios activos fueron separados en fracciones de acuerdo a sus características, facilitando su identificación mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

En la tabla 3, los fitoconstituyentes encontrados en la fracción soluble e insoluble fueron: Taninos, flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas; estas interacciones estuvieron en función de la polaridad y tamaño del solvente, y de esa manera fueron extraídos o disueltos los principios activos.

Asimismo fueron más fáciles de extraer los compuestos que tuvieron mayor afinidad química con los solventes utilizados, considerando que "lo semejante disuelve a lo semejante", es decir que aquellas sustancias que tienen estructuras similares deben ser afines entre sí²³.

Los metabolitos secundarios encontrados en la planta medicinal tuvieron estructuras químicas semejantes a algunos solventes, clasificándolos en polares, semipolares y no polares^{19, 23}.

Respecto a la tabla 4, al analizar el tipo de flavonoide contenido en la muestra vegetal *Plukenetia volubilis L.* se pudo determinar cualitativamente que se trata de la presencia de flavonoles, ya que el magnesio divalente presenta dos enlaces de coordinación fuertes y dos débiles; los primeros son formados por los oxígenos de los grupos carbonilos y los segundos por los hidroxilos de la posición 3, de esta manera la intensidad aumenta dando como resultado una coloración roja cuando se realiza el ensayo de shinoda; al mismo tiempo para comprobar la presencia de flavonoles se procedió a agregar una solución de ácido sulfúrico concentrado al extracto hidroalcohólico de *Plukenetia volubilis L.*, resultando en una coloración ligeramente amarilla^{19, 23, 25}.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos, siendo éste último el más común. Debido a la complejidad de éstas mezclas, es frecuente el estudio de éstos compuestos en forma de agliconas en extractos de plantas previamente hidrolizados. Estos metabolitos secundarios se hallan en todas las partes de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo frecuentes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia isoflavonas, chalconas y auronas¹⁹. Basándose en esto, se procedió a hidrolizar el extracto hidroalcohólico de *Plukenetia volubilis L.* y someterlo a un método de análisis específico como es el ultravioleta, y poder determinar el espectro de absorción de la muestra vegetal, debido a la presencia de grupos cromóforos presentes en la estructura de los flavonoides. Estos presentan absorciones características en el ultravioleta, las cuales están sujetas a desplazamientos pronosticables en medio ácido y contribuyeron a dilucidar su estructura^{19, 23}.

La participación de especies de oxígeno reactivas en la etiología y fisiopatología de enfermedades humanas tales como trastornos neurodegenerativos, inflamación, infección viral, patologías autoinmunes y trastornos del sistema digestivo tales como inflamación gastrointestinal y úlcera gástrica, es ya evidente. Para comprender el papel de estas especies de oxígeno reactivas en diversos trastornos, y el posible efecto antioxidante de los compuestos naturales en los tejidos afectados, se hace necesario investigar *in vitro* las propiedades neutralizantes de cualquier fármaco o producto natural antes de considerarlo una sustancia antioxidante, y realizar a continuación una evaluación de su función en sistemas biológicos^{26, 27}.

En la tabla 5, apreciamos la concentración de malonaldehído en la lipoperoxidación inducida por Fe^{3+} /ascorbato a las concentraciones de 70 y 140mg/mL respectivamente, del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. en homogenizado hepático de *Rattus rattus* var. albinus. Para la realización de este proceso antioxidante se trabajó con tres grupos experimentales: control, problema 1 (*Plukenetia volubilis* L. 70mg/mL) y problema 2 (*Plukenetia volubilis* L. 140mg/mL), dando como resultado valores promedio de malonaldehído expresado en $\mu\text{g/mL}$ de 68.7368, 38.8684 y 41 respectivamente para cada grupo de tratamiento.

Respecto al órgano que fue utilizado en la presente investigación, para justificar el uso del tejido hepático en el efecto antioxidante *in vitro* de *Plukenetia volubilis* L. en las 19 especies analizadas de *Rattus rattus* var. albinus, se basó en que está probado que el hígado posee mayor capacidad de respuesta frente a la agresión tóxica en comparación a cualquier otro órgano, debido a su misión clave como vía primaria de desintoxicación. Del mismo modo esta misión del hígado puede ser la causa de su propia lesión, ya que en la biotransformación de sustancias tóxicas pueden generarse metabolitos, en ocasiones más tóxicos que la sustancia de partida, los que en ocasiones pueden producir lesiones hepatocelulares, tales como: nódulos hiperplásicos, cirrosis y en circunstancias extremas cáncer y muerte celular²⁷. Redd, Minotti y Nicotera informan que estos daños van precedidos por una pérdida de equivalentes de glutatión, una marcada oxidación de grupos tiólicos de las proteínas, peroxidación de los lípidos de la membrana y elevación del calcio citoplasmático.^{28, 29, 30}

Los valores promedio de los tres grupos experimentales del presente trabajo demuestran que la peroxidación (autooxidación) de los lípidos inducida con Fe^{3+} /ascorbato se debe a que la lipoperoxidación es estimulada por el ácido ascórbico en presencia de sales de hierro o cobre, reacción que se produce con la formación de especies reactivas como son los radicales hidroxilo. En contraposición a ello, el ascorbato tiene la capacidad de conferir una eficiente protección contra la lipoperoxidación por lo que en este contexto se puede restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E-oxidada, constituyéndose en una de las funciones más importantes de esta vitamina^{30, 31}.

Al observar las tablas 6 y 7, el valor promedio del grupo de tratamiento expresado en concentración de MDA a la dosis de 70 mg/mL fue 38.8684 $\mu\text{g/mL}$ y a la dosis de 140 mg/mL fue 41 $\mu\text{g/mL}$, encontrándose diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) en ambos grupos de tratamiento cuando fue comparado con el grupo control, utilizando la prueba estadística "t" de datos apareados. Estos resultados nos sugiere que el extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. demostró una fuerte inhibición de la peroxidación lipídica inducida por el complejo Fierro³⁺/ascorbato

en homogenizado de hígado de rata.

La medición de la capacidad reductiva apreciada se realizó mediante transformación de Fe^{3+} - Fe^{2+} en presencia del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L., asociándose el poder reductor a la actividad antioxidante. Como se indica en la tabla 7, el extracto etanólico presentó un poder reductor tanto en el grupo de 70 mg/mL como en el grupo de 140 mg/mL de *Plukenetia volubilis* L. La peroxidación lipídica fue indicada con el ataque de los radicales libres a los ácidos grasos insaturados, y se propagó mediante un ciclo de reacción en cadena. Como los ácidos grasos insaturados son los componentes más importantes de las membranas biológicas y aportan propiedades deseables a la fluidez de la estructura de la membrana celular, la peroxidación de los ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas conllevó a la aparición de trastornos en la estructura y el funcionamiento de la membrana.

Analizando mediante el uso de la prueba t student las tablas 8, 9 y 10; al comparar en la tabla 8 la dosis mínima y la dosis máxima para determinar diferencia significativa, dió como resultado $p > 0.05$ no encontrándose diferencia estadística entre ambos grupos de tratamiento; del mismo modo al observar las tablas 9 y 10, al comparar los valores promedio de los grupos de tratamiento de la dosis mínima y la dosis máxima frente al grupo control (68.7368 $\mu\text{g/mL}$), se encontró diferencia estadística altamente significativa ($p < 0,001$) en ambos grupos de tratamiento analizados. Estos resultados encontrados en las tablas 9 y 10 nos indicarían que la inhibición de la peroxidación lipídica no sería dosis dependiente^{27, 32}.

Shahidi y Sawa demuestran que ciertos productos de las plantas incluyen sustancias fenólicas, como flavonoides y taninos. Estas sustancias antioxidantes naturales tienen normalmente una fracción fenólica en su estructura molecular, entre los que han destacado flavonoides, tocoferoles y catequinas. Los antioxidantes fenólicos tienen un gran poder destructor de radicales libres, al ser componentes biológicamente activos, son los principales agentes que pueden donar oxígeno a los radicales libres y de esta forma romper la cadena de la oxidación lipídica en el primer paso de iniciación. Este elevado potencial de los compuestos fenólicos para la neutralización de radicales se puede deber a sus grupos hidroxilo fenólicos. La actividad del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis* L. a las dosis de 70 y 140 mg/mL respectivamente, podría deberse a la presencia de glucósidos fenólicos. Sin embargo, el mecanismo exacto de actuación sólo se puede determinar tras la caracterización detallada de las fracciones activas del extracto^{32, 33}.

El valor antioxidante de una planta está relacionado, no sólo, con su composición química global, sino con la cantidad y calidad de antioxidantes, la que a su vez estaría en función con el contenido de flavonoides y su mejor eficacia en la prevención y neutralización de los radicales libres^{20, 32}.

La mayor protección contra la autooxidación que tendría *Plukenetia volubilis L.*, se explicaría en el hecho de que en los mamíferos el efecto conjunto de la defensa contra la lesión oxidativa se mide por el índice de autooxidación en homogenizados de hígado, el mismo que es un órgano de alto índice metabólico, donde se espera más protección contra la autooxidación alimentaria, de manera proporcional mejora la calidad de vida de las especies^{20, 33}.

En tal sentido el efecto antioxidante de *Plukenetia volubilis L.* a nivel hepático nos induce a considerar su uso en bien de la salud, pero teniendo cuidado en la dosificación ya que un incremento puede tener efectos positivos, o negativos, tal como lo demuestran los estudios realizados por Sinet sobre síndrome de Down, donde indican que un incremento en las concentraciones de la superóxido dismutasa, tienen efectos deletéreos; o en el caso del antioxidante cisteína que puede tener

un efecto prooxidante dado que genera durante su oxidación radicales libres^{18, 34}.

Si bien hasta ahora las opiniones son muchas acerca del papel protector de *Plukenetia volubilis L.* en muchas dolencias, los resultados de este estudio preliminar sobre su valor antioxidante, no hacen más que abrir nuevas rutas a la investigación para encontrar nuevas fuentes de antioxidantes no convencionales que eviten que muchas enfermedades continúen diezmando la población en el mundo y disminuyendo la calidad de vida de las personas.

Se puede concluir que la actividad neutralizante de los radicales libres del extracto etanólico de *Plukenetia volubilis L.* puede desarrollarse según uno de los mecanismos anteriores al demostrar su eficacia en la medicina tradicional. Se deben realizar estudios adicionales *in vivo* de los principios activos³⁴.

CONCLUSIONES

Al finalizar el trabajo de investigación para determinar el estudio fitoquímico de *Plukenetia volubilis L.* y su efecto antioxidante en la lipoperoxidación inducida por Fe³⁺/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. *albinus*, se puede concluir en lo siguiente:

Los fitoconstituyentes determinados en las hojas y tallos de *Plukenetia volubilis L.* son: taninos, flavonoides, esteroides y alcaloides.

El extracto etanólico de *Plukenetia volubilis L.* presenta efecto antioxidante *in vitro* en hígado de *Rattus rattus* var. *albinus*.

No fueron encontrados conflictos de interés en este artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Claus E. Farmacognosia. 6ª ed. Edit. El Ateneo. 1995:135-136, 238-241.
- Vega R, García A. Toxicidad de un extracto tánico de *Pinus caribaea* Morelet. *Rev Cubana Plant Med* 2005; 10(2).
- Moure A, Cruz J, Franco D. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. February 2001; 72(2):145-171.
- Selema G, Martínez J. Efecto hepatoprotector inducido por el flavonoide astilbina frente a un modelo animal tratado con tetracloruro de carbono. *Rev Cubana Plant Med* 1999; 1(4):36-39.
- Pérez J. Actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de un extracto natural de origen vegetal. *Rev. Cubana Plantas Medicinales* 1998; 3(3):19-22.
- Concytec. Plantas Medicinales en el Perú. 1ra. ed. Lima, Perú. 1995:58-62.
- Minotti G, August S. Redox cyclin of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 1992, 27:219-226.
- Montgomery R. Bioquímica, casos y textos. 6ta ed. Edit. Harcourt Brace de España, S.A. 1998.
- Ajit K. Age-Associated Changes in Antioxidants and Antioxidative Enzymes in Rats. *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. 1991; 59:123-128.
- Murray R. Bioquímica de Harper, 14ava. ed. Edit. Manual Moderno S.A. de C.V. México (México), 1997:187, 720-731, 863.
- Halliwell B. Radicales libres, antioxidantes y enfermedad humana: ¿Curiosidad, causa o consecuencia? *The Lancet* 1994; 344: 721-724.
- Arévalo G. El cultivo del sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) en la Amazonía. Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología - PRONARGEB, Estación Experimental El Porvenir - Tarapoto, Peru. 1995.
- Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA)[en línea]. Sacha inchi: Planta Prometedora de la Amazonía Peruana [consulta: 24 mayo 2008]. También disponible en: <http://www.inia.gob.pe>.
- Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA)[en línea]. Cultivo de sacha inchi [consulta: 24 mayo 2008]. También disponible en: <http://www.incainchi.es/pdf/1358.pdf>
- Vela S. Ensayos para la extracción y caracterización de aceite de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*) en el departamento de San Martín. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional San Martín. Tarapoto, Peru. 1995.
- Obregón A, Martínez E, Navarro E. Hidrólisis de las Proteínas concentradas de la torta de sacha inchi (*Plukenetia volubilis L.*). Universidad Nacional de San Martín. Tarapoto, Perú. 1998.
- Hamaker B, Valles C, Gilman R. Amino acid and fatty acid profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis L.*). *Cereal chem*. 1992; 69(4):461-463.
- Pretel O. Efecto Antioxidante de *Plantago major L.* "Llantén" en la lipoperoxidación inducida con Fe³⁺/ascorbato en hígado de *Rattus rattus* var. *albinus*. Trabajo de Habilitación para Ascenso de Categoría docente. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 2001:14-18.

19. Lock O. Investigación fitoquímica – métodos en el estudio de productos naturales. 2º ed. Ed. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú. 1994:114-115.
20. Diaz A, Godoy L, Naranjo J, Squella M. Antioxidant effects of 1,4- dihydropyridine and nitroso aryl derivatives of the Fe³⁺/ascorbate stimulated lipid peroxidation in rat brain slices. Gen Pharmac. USA. 1998; 3(3).
21. Mai J. Antioxidant and Radical Scavenging Effects of Aged Garlis Extract and its Constituents. Plan. Med. 1994; 60: 417-420.
22. Avendaño C. Introducción a la Química Farmacéutica. 2da ed. Edit. Mc Graw-Hill. Madrid, España. 2001:850.
23. Miranda M, Cuellar A. Farmacognosia y productos naturales. 1era ed. Edit. Félix Varela. La Habana, Cuba. 2001:147-170.
24. Kuklinski C. Farmacognosia. 1ra. ed. Edit. Omega. España. 2000:3-39.
25. Ganoza M. Fundamentación química de las reacciones de coloración y precipitación en la identificación de metabolitos secundarios de plantas medicinales. Tesis. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú. 2001:8-10.
26. Repetto M, Llesuy S. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcer. Braz.J.med.Biol.Res. 2002; 35(5):523-534.
27. Bafna A, Mishra S. Actividad antioxidante in vitro del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchiooides* Gaertn. Ars Pharm 2005; 46 (2): 125-138.
28. Redd D. Review of the current status of calcium and thiols in celular injury. Chem. Res. Toxicol. 1990; 3:495-502.
29. Minotti G, August S. Redox cuclin of iron and lipid peroxidation. Lipids 1992; 27:219-226.
30. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. Calcium mediated mechanisms in chemically induced cell death. Ann. Rev. Pharmacol toxicol 1992; 82:449.
31. Jialal L, Vega G. Physiologic levels of ascorbat inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. Atherosclerosis 1990; 82:185-99.
32. Shahidi F, Wanasundara PKJPD. Phenolic antioxidants. Crit. Rev. Food Sci. Nutrit. 1992; 32: 67-103.
33. Sawa T, Nakao M, Akaike T, Ono K, Maeda H. Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the antitumor promoter effect of vegetables. J. Agric. Food Chem. 1999; 47: 397-492.
34. Sinet P. Metabolism of oxygen derivatives in down's syndrome. Ann Ny. Acad. Sci 1982; 396:83-94.

Recibido: 13 Diciembre 2009 | **Aceptado:** 26 Marzo 2010