

Efecto del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum*, procedente de Otuzco y Trujillo, en la oxidación de la LDL humana, *in vitro*.

Effect of Ethanolic Extract of Piper Aduncum Leaves, from Otuzco and Trujillo, on Human LDL Oxidation in Vitro

RENGIFO PENADILLOS, Roger Antonio

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene el propósito de estudiar el efecto del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L., "matico" de diferente procedencia, en la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) humana *in vitro*. Se recolectó las hojas de la especie en enero del 2017 en los distritos de Otuzco y de Trujillo; los extractos etanólicos de hojas de *Piper aduncum* L., se obtuvieron por el método soxhlet, y fueron evaporados hasta la tercera parte de su volumen en un baño maría, secándose en estufa a 40°C durante 24 horas; a partir del extracto seco se prepararon soluciones a la concentración de 0,2 mg /mL. La LDL se aisló desde muestras sanguíneas de 81 personas por el Método de Ultra centrifugación; determinándose el grado de inhibición de la oxidación de LDL por el método de TBARS, se conformó tres grupos de trabajo: un grupo control y dos grupos problemas, de acuerdo a la zona de procedencia de las hojas La concentración de malondialdehído (MDA) en el grupo control es $0,0114 \pm 0,00025$ nmol/100µL, en el grupo problema 1 es $0,0026 \pm 0,0001$ nmol/100 uL y en el grupo problema 2 es $0,0053 \pm 0,00008$ nmol/100 µL. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L. procedente del distrito de Otuzco inhibe la oxidación de LDL humana en un 77,04%, mientras que el que procede del distrito de Trujillo lo hace en 53,51%, *in vitro*

Palabras clave: Extracto etanólico, *Piper aduncum*, LDL.

ABSTRACT

The present research aims to study the effect of ethanolic extract from the leaves of *Piper aduncum* L., "matico" from different sources, on the oxidation of human low-density lipoproteins (LDL) *in vitro*. The leaves of the species were collected in January 2017 in the districts of Otuzco and Trujillo; the ethanolic extracts of *Piper aduncum* L. leaves were obtained by the Soxhlet method, and were evaporated to one third of their volume in a bain-marie, drying in an oven at 40°C for 24 hours; Solutions at a concentration of 0.2 mg /mL were prepared from the dry extract. LDL was isolated from blood samples of 81 persons using the Ultra Centrifugation Method; The inhibition degree of LDL oxidation was determined by the TBARS method, and three working groups were formed: a control group and two problem groups, according to the area of origin of the leaves. The concentration of malondialdehyde (MDA) in the control group is 0.0114 ± 0.00025 nmol/100 µL, in problem group 1 it is 0.0026 ± 0.0001 nmol/100 uL and in problem group 2 it is 0.0053 ± 0.00008 nmol/100 µL. It is concluded that the ethanolic extract of *Piper aduncum* L. leaves from Otuzco district inhibits human LDL oxidation by 77.04%, while the one from Trujillo district does so by 53.51%, *in vitro*.

Keywords: Ethanolic extract, *Piper aduncum*, LDL

INTRODUCCIÓN

La selección de las plantas medicinales basada en los usos tradicionales por la población es el criterio más popular en la investigación fitoquímica a la búsqueda de compuestos activos, especialmente en sociedades donde la etnomedicina es la principal fuente de tratamiento sanitario. Sin embargo, al usar este método se debe tener en cuenta que el uso tradicional no necesariamente debe coincidir con el concepto de la medicina moderna, por lo que el extracto seleccionado no debe estudiarse únicamente por la actividad programada por los curanderos, sino por una gama más amplia de modelos biológicos (1).

La especie *Piper aduncum*, matico, crece como silvestre en muchos lugares del Perú, siendo aprovechada por menos del 5% de la población, por desconocimiento de sus propiedades medicinales o simplemente, falta de costumbre o por no tener confianza en la planta natural y tener preferencia por los productos sintéticos (2).

En la actualidad, su uso etnomedicinal es múltiple y variado siendo empleado en infusión para aliviar y curar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, antitusígeno y antiséptico, bueno para bronquitis, amigdalitis, otitis), en dolencias gastrointestinales (diarreas agudas o crónicas, disentería) y como vulnerario en decocto (para el lavado de heridas externas). Igualmente la infusión de estas hojas juntamente con otras como la malva de olor es muy útil para los baños de asiento y lavados vaginales siendo útil en los descensos fluidos y blanquecinos causados por el parásito *Trichomona vaginalis*. Para el empacho y enfermedades gastrointestinales, se deben soasar 2 ó 3 hojas a fuego lento y frotarse todo el estómago. Puede utilizar en niños desnutridos para evitar la infección microbiana. Puede masticarse las hojas directamente (cuando hay dolor de garganta), tragando el jugo dará buenos resultados, si produce irritación en el estómago hacerlo después de ingerir las comidas (2).

Entre los compuestos fenólicos, que constituyen un grupo numeroso de metabolitos secundarios

proveniente de fuentes naturales, destacan los flavonoides con propiedades de protección de los tejidos frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la peroxidación lipídica (3).

Esto ha posicionado a los productos naturales como una fuente de compuestos con potencial antioxidante comparable con la de los sintéticos (4,5). Además presentan actividades antiinflamatoria y antiartrítica (6) asociadas con la habilidad de reducir especies reactivas de oxígeno y de inhibir enzimas como la fosfolipasa A2 y la ciclooxigenasa (6,7). Estos compuestos actúan a menudo de forma sinérgica con las vitaminas A, C y E, aumentando y prolongando los beneficios de las mismas (8).

Se ha comprobado que los compuestos fenólicos tienen capacidad para actuar como dadores de electrones o quelantes de iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las LDL están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias y, además, está ampliamente aceptado que la oxidación de estas lipoproteínas es un punto de inicio de la lesión arterial. Se pudo comprobar que debido a las observaciones realizadas en los cambios que sufrían las LDL al ser oxidadas y posteriormente convertidas a sus formas aterogénicas (oxLDL) y reconocidas por receptores "scavenger" de macrófagos (9).

Por estos considerandos, el presente trabajo de investigación tiene el propósito de estudiar la influencia de la zona geográfica en el efecto de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* L., "matico", en la oxidación de la LDL humana, *in vitro*, con lo cual se pretende verificar las propiedades terapéuticas que la medicina popular atribuye a dicha especie vegetal.

Por ello se planteó el siguiente problema: ¿Tendrá algún efecto extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum*, en la oxidación de LDL humana, *in vitro*?

Considerándose la siguiente hipótesis:

El extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum*, inhiben la oxidación de la LDL humana, *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Material vegetal

2 Kg de hojas de *Piper aduncum* L., fueron recolectadas en el distrito de Otuzco (7°54'10" latitud Sur y 78°34'20" longitud Oeste) y en el Jardín botánico "Rosa Elena de los Ríos Martínez", de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo del distrito de Trujillo (8°24'18" latitud Sur y 79°36'23" longitud Oeste), del Departamento de La Libertad.

2.1.2. Material Biológico

81 muestras sanguíneas de voluntarios, de ambos sexos, estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. El estudio se realizó cumpliendo las normas de bioseguridad estipuladas por la OMS

2.2. MÉTODO

2.2.1. Recolección de la materia prima:

Las hojas de *Piper aduncum* L. fueron recolectadas en el distrito de Otuzco y en el Jardín botánico Rosa Elena de los Ríos Martínez, de la Facultad de

Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. La recolección de la especie se realizó por el método convencional o clásico de herborización, seleccionando el material en el campo y verificando que estuviera en buenas condiciones.

2.2.2. Identificación de las hojas de *Piper aduncum*

La planta fue llevada al Herbario Truxillense, para su identificación y depósito. Almacenándose los ejemplares de la especie de Otuzco con el código 57 600 y la de Trujillo con el código 58 325

2.2.3. Lavado y secado: (10).

Luego de la separación de las sustancias extrañas, se procedió a lavar las hojas con agua potable a chorro y después con agua destilada, seguidamente fueron secadas a temperatura ambiente, bajo sombra durante dos días. Posteriormente se colocaron en la estufa, a una temperatura de 40 °C por 24 horas.

2.2.4. Molienda: (10).

Las hojas secas se pulverizaron empleando un mortero.

2.2.5. Tamizado:(10).

El polvo obtenido fue tamizado usando el tamiz N°75 para obtener polvo fino, este producto fue almacenado en frascos de vidrio ámbar.

2.2.6. Obtención del extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum L.* (11)

10 g del polvo fino de hoja de *Piper aduncum L.* fue mezclado con cantidad suficiente de arena lavada y tratada, extrayéndose los principios activos a través del método Soxhlet, con 100 mL de etanol 96° G.L, durante 6 horas, el extracto etanólico obtenido se evaporó en baño María hasta un tercio de su volumen inicial, llevándose seguidamente a estufa a 40°C hasta peso constante. Se pesó 5 mg de extracto seco de hoja de *Piper aduncum*, disolviéndose en 25 mL de etanol 96° G.L., el extracto etanólico obtenido estará a la concentración de 0,2 mg e.s/mL de extracto etanólico. El mismo procedimiento se aplicó a las muestras de los distritos de Otuzco y de Trujillo.

2.2.7. Entrega de la carta de consentimiento informado:

Luego de informar a las personas voluntarias del estudio a realizar, se procedió al llenado y firma de la carta de Consentimiento Informado.

2.2.8. Aislamiento de LDL

Método de Ultra centrifugación (12).

Las personas voluntarias que participaron en el mencionado estudio acudieron en ayunas (de 12 a 16 horas) para la extracción de muestra sanguínea de la vena media cubital del antebrazo, en cantidad aproximada de 6 mL, colocándose esta en tubos limpios vacutainer sin anticoagulante. Este procedimiento se realizó cumpliendo las normas de bioseguridad estipuladas por la OMS, así mismo dichas muestras fueron obtenidas por personal debidamente capacitado. Se obtendrá el suero

de manera usual. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado del reactivo LDL colesterol. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las HDL y VLDL y las LDL precipitan.

2.2.9. Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (13).

a. Oxidación de la LDL

Las muestras de LDL fueron repartidas en tres grupos experimentales:

Grupo Control: 27 muestras de LDL

Grupo Problema 1: 27 muestras de LDL con extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum L.* procedentes del distrito de Otuzco.

Grupo Problema 2: 27 muestras de LDL con extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum L.* procedentes del Jardín Botánico Rosa Elena de los Ríos Martínez de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional de Trujillo del distrito de Trujillo.

Del grupo control se transfirió 0,1mL de LDL a tubos de ensayo, agregándose 0,2 mL de etanol de 96 ° G.L; de los grupos problema 1 y 2, se midió 0,1mL de LDL transfiriéndose a tubos de ensayo añadiéndose 0,2 mL del extracto etanólico respectivo. La oxidación de la LDL se inició con la adición de 0,1 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, a todos los tubos de ensayo, incubándose durante 30 minutos a 37°C.

b. Determinación de TBARS

Seguidamente se añadió 1 mL ácido tricloroacético (TCA) al 20%, llevándose a ebullición en un baño de agua a 100°C durante 30 minutos, luego la suspensión se centrifugó a 1 700 rpm por 20 minutos, decantándose en tubos limpios a los que se les agregó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%, continuándose con la ebullición en un baño de agua a 100°C durante 30 minutos, después del tiempo transcurrido se volvió a centrifugar a 1 700 rpm por 20 minutos, cada sobrenadante se transfirió a la celda de un espectrofotómetro, para leer la absorbancia a 535 nm frente a un blanco de reactivos. La concentración de malondialdehído (MDA) se calculó a partir de su coeficiente de extinción ($1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se expresa en nM por 100 uL de suero, mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{MDA}] = (A_{\text{MP}} - A_{\text{BL}}) / 0,154$$

Donde:

A_{MP} : Absorbancia de la muestra problema.

A_{BL} : Absorbancia del blanco

0: Coeficiente de extinción del MDA en $1,54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b: Paso óptico en cm.

2.2.10. Evaluación Estadística. (14)

Los resultados se analizaron mediante la prueba de t de student para estimar la diferencia de medias entre grupos Se considerará estadísticamente significativo el valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

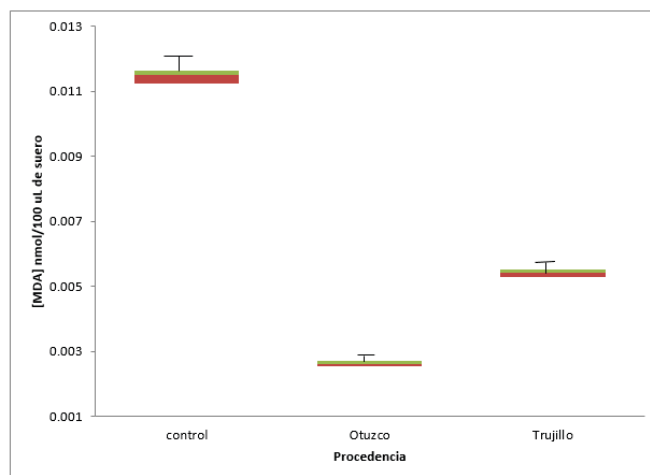


Figura 1: Concentración de Malondialdehído en los grupos Control, Otuzco y Trujillo.

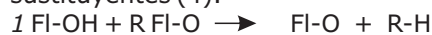
Tabla 1. Grado de inhibición de la oxidación lipídica por el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum L.*, en base a la concentración de MDA formado.

Grupo	Promedio [MDA nmol/100 uL de suero]	Grado de inhibición (%)
Control	0,0114 ± 0,00025	
Otuzco	0,0026 ± 0,0001	77,04
Trujillo	0,0053 ± 0,00008	53,51

DISCUSIÓN

La actividad antioxidante de los extractos polares es debida, a la presencia de sustancias con grupos hidroxilos, los cuales ejercen su acción por donación de protones, o bien por interacción, adición o combinación de radicales o por reacciones redox (transferencia de electrones).

De hecho, las reacciones más utilizadas para comprender la capacidad de reducción de radicales libres, son las que a continuación se mencionan, esto es debido a la alta reactividad de los grupos hidroxilo presentes como sustituyentes (4).



La reducción del radical libre se produce por la donación de un electrón por el flavonoide, generándose el radical flavonoide, el mecanismo de terminación de la reacción puede deberse cuando dos radicales flavonoides se acoplan (dimerización) 2a; un radical flavonoide se acopla con un radical libre R 2b; la formación de una semiquinona, por deslocalización del electrón la cual es precursora de la quinona más estable 2c (4). De los grupos hidroxilos presentes en los anillos A y B de los flavonoides, los ubicados en posición orto en el anillo B son los

que le dan la actividad antioxidante.

Después de oxidar la LDL con $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, se utilizó como índice de la lipoperoxidación de ésta la formación de malondialdehído (MDA).

Las especies reactivas de oxígeno (EROS) son, en alto porcentaje, sustancias moleculares con un electrón desapareado en su estructura que la hace muy reactivo, el exceso de producción de estas especies puede causar daños graves para las células. Por este razón es prioritario conservar un equilibrio entre su producción y los mecanismos que protejan a las células de sus efectos nocivos y cuando estos no funcionan muy bien entonces se debe aplicar sustancias antioxidantes que complementen la acción (9).

Se entiende por lipoperoxidación cuando los radicales libres interactúan con ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares oxidando a las mismas. El malondialdehído (MDA) es un ácido graso involucrado en este proceso como producto final de la oxidación de los lípidos de membranas. Las sustancias que inhiben la peroxidación lipídica son aquellas que están contenidas en los extractos y actúan impidiendo la formación del MDA (6).

Grada M, y Col. en su trabajo de investigación intitulado: Evaluación de la inhibición de lipoperoxidación (TBARS) en eritrocitos humanos

por extractos de *Crataegus mexicana*, concluyen que este extracto inhibe en un 48% la lipoperoxidación en eritrocitos humanos Ybañez R. determinó el efecto del extracto de *Lepidium meyenii walp* (ecotipos rojo y negro) sobre malondialdehído (MDA) sérico, peso uterino y citología vaginal en *Rattus norvegicus var. albinus*, a gran altura y a nivel del mar, encontrando que a dosis de 1,5 g/Kg de *Lepidium meyenii walp*, la disminución de MDA es significativa

De los resultados mostrados en la figura 1 se observa que la oxidación de la LDL, fue inhibida después de la adición de una concentración de 0,2 mg es/mL de extracto etanólico de la especie en estudio, tanto para la muestra procedente de Otuzco como para la de Trujillo; la concentración promedio de MDA es $0,0026 \pm 0,0001$ nmol/100 uL de suero y de $0,0053 \pm 0,00008$ nmol/100 uL

de suero, respectivamente, cantidades inferiores al del grupo control, $0,0114 \pm 0,00025$ nmol/100 uL de suero, por lo que el extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* presenta la capacidad de inhibir la formación de lipoperóxidos, la especie procedente de Otuzco presenta el máximo grado de inhibición sobre la oxidación de la LDL humana de 77,04%., superior al encontrado por Grada M, y Col. en la evaluación de la inhibición de lipoperoxidación (TBARS) en eritrocitos humanos por extractos de *Crataegus mexicana*, que fue de 48%.

Lo importante de este trabajo de investigación radica en demostrar que la intensidad del efecto antioxidante del extracto etanólico de las hojas de *Piper aduncum* sobre la LDL, *in vitro*, va depender de la zona origen de la especie en estudio, lo cual se evidencia en la diferencia significativa del grado de inhibición de la lipoperoxidación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chu Ch. and Cutler H. Natural Products as Antiviral Agents. Plenum Press, New York.1991.
2. Rengifo R. Determinación de la actividad antibacteriana, in vitro de los extractos de hojas de *Piper aduncum* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis para optar el grado de Maestro en Farmacia y Bioquímica. Mención en productos Naturales Terapéuticos. Escuela de Postgrado. Universidad Nacional de Trujillo. 2009.pp.1, 2.
3. Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. Flavonoid antioxidants chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J NutrBiochem. 2002.13 (10): 572-584.
4. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyananda R. Review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. Food and Bioproducts Processing. 2011.89(3):217-233.
5. Mesa A, et. al. Actividad antioxidante de *Piper piedecuesta numtrel.* & *yunck.* Y *Piper subpedaletrel.* & *yunck.* Rev. Latinoamer.Quím.2011.39 (3): 91 - 99.
6. Yamaguchi L, Vassão D, Kato M, Di Mascio P. Biflavonoids from brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. Phytochemistry.2005.66 (18): 2238-2247
7. Wang J, Sun Y, Cao Y, Wang C. Wheat bran feruloyl oligosaccharides enhance the antioxidant activity of rat plasma, Food Chemistry. 2010.123(2), 472-476.
8. Soobrattee M, Neergheen V, Luximon-Ramma A, Aruoma O, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutat Res. 2005.579 (1-2):200-213.
9. Chisolm G, Hazen S, Fox P, Cathcart M. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochem. Biol. Mech. 1999.274 (37): 25959-25962.
10. Sharapin N y col. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. CYTED. Colombia.2000. pp 24,25,28,29
11. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de Laboratorio Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de la Habana. Cuba. 2000.Pp. 43-50.
12. Ceron W y Zambrano E. Interferencias producidas por sueros lipemicos en la medición de analitos bioquímicos, en pacientes que acuden al laboratorio clínico de la unidad médica universitaria del cantón Portoviejo de la provincia de Manabí, en el período mayo - octubre de 2011.Tesis de grado para la obtención del título de licenciada en laboratorio clínico. Universidad técnica de Manabí. Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de laboratorio clínico. Ecuador. 2011. pp 20.
13. Osorio E, Montoya G, Bastida J. Caracterización fitoquímica de una fracción de biflavonoides de *Garcinia madruno*: su inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias. Universidad de Antioquia Colombia. 2009.Núm. 3: 369-377. Fecha de acceso [5 de Junio de 2014]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfR.ed.jsp?iCve=169813261011>.
14. Rius F, Barón F. 2005. Bioestadística. Thomson Paraninfo. Madrid. Pp. 233-241.