

ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD A DOSIS LÍMITE DE *Triplaris americana* L. (TANGARANA COLORADA)

Miguel Angel Inocente Camones ^{*a}, César Fuertes Ruiton ^b, Bertha Jurado Teixeira ^a, Iris Giovana Mondragón Tarrillo ^a, Evelyng Del Rosario Taype Espinoza ^a, Henry Ostos Flor ^c.

RESUMEN

En el análisis farmacognóstico del extracto hidroalcohólico de la corteza de *Triplaris americana* L., se han evidenciado compuestos fenólicos: taninos y flavonoides. Se evaluó la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico, aplicando el método del DPPH, obteniendo como concentración inhibitoria IC₅₀ 9,5498 ug/mL, con resultado levemente superior comparado con el estándar trolox. Al evaluar la toxicidad a dosis límite del extracto hidroalcohólico (2000 mg/kg de masa corporal), no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales de experimentación.

Palabras clave: *Triplaris americana* L., cuantificación, taninos, antioxidante, DPPH, toxicidad.

PHARMACOGNOSTIC STUDY, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOXICITY TO DOSE LIMIT OF *Triplaris americana* L. (TANGARANA COLORADA)

ABSTRACT

In the pharmacognostic analysis of the hydroalcoholic extract of the bark of *Triplaris americana* L., has been evidenced phenolics compound: tannins and flavonoids. The antioxidant activity of the extract hydroalcoholic was evaluated, applying the method of the DPPH obtaining as inhibitory concentration IC₅₀ 9, 5498 ug/mL, with slightly superior result compared with the standard trolox. When evaluating the toxicity to unique dose of the hydroalcoholic extract (2000 mg/kg of corporal mass), mortality didn't take place neither they showed indicative symptoms of toxicity in the experimental animals.

Key words: *Triplaris americana* L., quantification, tannins, antioxidant, DPPH, toxicity.

INTRODUCCIÓN

Triplaris americana L. es conocida vulgarmente como tangarana colorada, santo palo, cumbi, palo de hormiga, árbol de hormiga, es un árbol mirmecófilo de casi 16 metros de altura. *Triplaris americana* L., es una especie endémica de América, crece a los 350 msnm, en los

^{*a} Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú. minocente@farmaceuticos.com ayrucosmetic@empresarios.com

^b Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara". Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú.

^c Laboratorio de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú.

departamentos de San Martín, Amazonas, Lima, Pasco, Junín, Huánuco, Loreto y Madre de Dios, también crece en países como Panamá, Guyana, Guyana Francesa, Surinam, Venezuela, Brasil, Bolivia, Colombia y Ecuador¹.

En la medicina tradicional peruana se utiliza la decocción o infusión de su corteza por vía oral para curar infecciones intestinales, fiebre, diarrea, dolor de muelas². El PRODAPP (Programa de Desarrollo Alternativo en las Áreas de Pozuzo y Pacalzú) para la atención primaria de la salud (APS) recomienda el uso de esta planta para el tratamiento de la malaria, en la región Huanuco³.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la presencia de metabolitos primarios y secundarios, la toxicidad aguda a dosis límite y la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de la corteza de tangarana colorada.

PARTE EXPERIMENTAL

Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Farmacognosia y Medicina Tradicional, Bioquímica y el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Materiales y reactivos

Muestra

El material objetivo de nuestro estudio estuvo constituido por la corteza de la especie *Triplaris americana* L. (Polygonaceae), planta femenina, recolectada en el pueblo de Chazuta, provincia de Tarapoto, departamento de San Martín; en época de verano, etapa de floración. La recolección se realizó con GPS de 900 a 1000 metros y coordenadas: 06°50'S 076° 60' W.

Reactivos

Molish, dragendorff, liebermann burchard, shinoda, borntranger, tricloruro de fierro 5%, acetato de etilo, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), metanol qp. (Aldrich Chemical Co.), etanol absoluto (Merck), trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromo-2 ácido carboxílico 97%) Aldrich (St. Louis, MO, USA). Agua desionizada pasteurizada, usados para todos los experimentos.

Equipos

Espectrofotómetro UV-visible (Spectroquant Pharo 300 Merck), balanza analítica de capacidad de 1 mg - 200 g (Ohaus Pioneer), lámpara UV 365 nm.

Material biológico

Se han utilizado 20 ratas albinas Sprague Dawley, con una masa corporal de 200 ± 20 g y edad de $7,5 \pm 0,5$ semanas. Los animales se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a una temperatura de $20 \pm 2^\circ$ C, con una humedad relativa entre 70 y 80% y ciclos luz/ oscuridad de 12/ 12 horas. Recibieron como alimento dieta balanceada, y agua apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y al agua fue *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a cuarentena e inspección clínica durante una semana antes del inicio del experimento, evitando el estrés.

Métodos de análisis

Elaboración del extracto

Mil cuatrocientos gramos (1400 g) de la corteza seca y molida de la planta fueron macerados en aproximadamente 5 L de alcohol etílico 70° durante 10 días, la solución resultante se filtró y se llevó a sequedad total; obteniéndose 400 gramos de extracto seco.

Estudio farmacognóstico

Ensayos preliminares

Con la finalidad de detectar los diferentes constituyentes químicos del extracto hidroalcohólico desecado, se emplearon los siguientes ensayos:^{4,5,6}

a) Ensayo organoléptico

Se realizó la caracterización organoléptica del extracto hidroalcohólico desecado, considerando aspecto, color, olor y sabor.

b) Ensayo biológico

Se determinó el índice hemolítico, para lo cual se utilizan placas petri con medio agar sangre, se colocaron discos estériles embebidos con el extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada, al 10%.

c) Ensayo físico

- Índice afrosimétrico (prueba de la espuma)

El extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada, al 10%, fue colocado en tubos de ensayos diferentes con un volumen doble de agua desionizada, se agitó y se dejó en reposo por media hora.

- Determinación del pH

Se midió el pH del extracto hidroalcohólico mediante potenciómetro electrónico, marca Shangai Precisión & Scientific.

- Marcha de solubilidades

En una batería de tubos de ensayo se colocó una pequeña porción del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza y se le agregó a cada uno 2 mL del solvente, en el siguiente orden: éter etílico, n-hexano, tolueno, cloroformo, acetato de etilo, dietilamina, 1-butanol, 1-propanol, etanol, metanol, ácido acético y agua desionizada.

Screening farmacognóstico

Ensayos de coloración

Se han realizado pruebas de color, en tubos de ensayo para determinar la presencia o ausencia de metabolitos primarios y secundarios más importantes, mediante la marcha farmacognóstica preliminar, según Lock, O.^{6,7}

Análisis cromatográfico. Cromatografía en capa fina

Se han utilizado cromatofolios con silicagel GF₂₅₄, en el cual se aplica el extracto hidroalcohólico, utilizando capilares nuevos; posteriormente colocados en cámaras de desarrollo cromatográfico, previamente saturadas probando diversos sistemas de solventes.^{7,8}

Resultando como mejores sistemas de solventes:

- acetato de etilo/ metanol/ agua (100:13,5:10 v/v) y (77:15:8 v/v) para glicósidos, flavonoides.
- 1-butanol/ ácido acético/ agua (4:1:5 v/v) (fase superior) para flavonoides y taninos.

Los cromatogramas fueron revelados con: rvo. dragendorff (alcaloides), rvo. potasa alcohólica 5% (quinonas, flavonoides, cumarinas), rvo. tricloruro de hierro 1% (fenólicos), rvo. liebermann-burchard, rvo. vainillín sulfúrico (saponinas, lactonas sesquiterpénicas), rvo. tricloruro de aluminio (flavonoides), luz UV a 254 nm.

Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de la corteza fue determinado usando el método 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).^{9,10} La concentración inicial del extracto hidroalcohólico desecado en agua desionizada pasteurizada (100 g/mL) permitió diluir a las concentraciones finales de 1, 5, 10, 15 y 20 g/mL, en agua desionizada pasteurizada. Luego, en

una batería de 5 tubos se colocaron 0,4 mL de cada solución preparada del extracto, y mezclado con 0,8 mL de la solución con el radical DPPH (2 mg%). La batería de tubos con la reacción fue colocada bajo oscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Se midió la absorbancia de cada tubo, a 517 nm.

El porcentaje de inhibición o porcentaje de decoloración fue calculado como:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A-B}{A} \cdot 100$$

Donde: **A:** Lectura de absorbancia del DPPH

B: Lectura de absorbancia de la muestra

La concentración requerida para el 50% de inhibición del radical libre DPPH (IC_{50}) fue calculada mediante la ecuación de la gráfica de concentración del extracto y trolox vs % inhibición.

El blanco para calibrar el equipo fue metanol: agua (2:1). El blanco para DPPH es (DPPH: metanol 2:1). Como control positivo se preparó una curva patrón de trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8 tetrametilcromo-2 ácido carboxílico 97%) a las mismas condiciones de análisis del extracto hidroalcohólico, para comparar las IC_{50} .

Evaluación de la toxicidad aguda a dosis límite

El procedimiento de dosis fijas fue adoptado en la guía N°. 420 de la OECD ¹¹ (OECD guideline for testing of chemicals, 2000)

Aleatoriamente se conformaron cuatro grupos experimentales, dos grupos tratados (01 grupo de machos y 01 grupo de hembras) y dos controles (01 grupo de machos y 01 grupo de hembras). La muestra fue administrada con un ayuno previo de 24 horas por vía oral mediante cánula intragástrica, a dosis única de 2000 mg/kg de masa corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración. Se dosificaron de acuerdo al peso de cada rata, administrándoles un volumen de 2 mL del extracto hidroalcohólico desecado disuelto en agua desionizada pasteurizada; y 2 mL del solvente para los grupos control.

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos, con especial atención durante las primeras 4 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento, recogiendo signos de toxicidad.

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, en el sistema respiratorio, en el circulatorio, en el nervioso central y en el autónomo, en la actividad somatomotora y en la conducta. Se prestó especial atención a la potencial ocurrencia de temor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.¹²

Se controló el peso vivo de los animales en los días 1, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad.

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados usando los programas microsoft excel 2007 (windows office) y minitab statistical software english (versión 15.00 para windows XP). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados expresados como valores promedios \pm desviación estándar.

En los ensayos de actividad antioxidante, se determinó el coeficiente de variación considerando como criterio c.v.f. 5%, y el coeficiente de correlación considerando como criterio R^2 0,990; de la relación % inhibición/ concentración de extracto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis farmacognóstico

Del análisis preliminar

Del ensayo organoléptico

Como característica del control de calidad, se presentan las características del extracto hidroalcohólico desecado (tabla 1).

Tabla 1. Características organolépticas del extracto hidroalcohólico desecado.

Característica	Resultado
Aspecto	Cristales pulverizados
Color	Rojo brillante
Olor	Sui géneris
Sabor	Amargo, astringente

Del ensayo biológico

- Índice hemolítico: Después de 24 horas no se observa halos de hemólisis.

Del ensayo físico

- Índice afrosimétrico: No se observó espuma persistente por más de 30 minutos.
- Determinación de pH: pH 4.
- Marcha de solubilidades: De acuerdo a la tabla 2.

Tabla 2. Solubilidades del extracto hidroalcohólico desecado.

Solventes	Resultados	Solventes	Resultados
Éter etílico	-	Butanol	-
N-hexano	-	Propanol	++
Tolueno	-	Etanol	++
Cloroformo	+	Metanol	+++
Acetato de etilo	-	Ácido acético	-
Dietilamina	-	Agua desionizada	++

Legenda: (-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Soluble (+++) Muy soluble

Del screening farmacognóstico

Se determinó la presencia de carbohidratos, flavonoides y taninos (tabla 3).

Tabla 3. Resultados del screening farmacognóstico del extracto hidroalcohólico.

Constituyentes químicos	Resultado	Constituyentes químicos	Resultado
Carbohidratos en general	+++	Flavonoides	++
Azúcares reductores	++	Esteroides y triterpenoides	-
Aminoácidos libres	-	Cardenólidos	-
Vitamina B1 (tiamina)	-	Cardiotónicos	-
Vitamina C	-	Alcaloides	-
Taninos	+++	Antraquinonas	-

Leyenda: +++ Abundante ++ Moderado + Leve (-) Ausencia

Del análisis cromatográfico

Con respecto al análisis cromatográfico efectuado al extracto hidroalcohólico desecado, es necesario señalar que la reacción resultó positiva frente al revelador potasa alcohólica 5%. El extracto mostró a simple vista siete manchas, en el cromatograma; y se hallaron los valores de Rf para las manchas del cromatograma, en la tabla 4.

Tabla 4. Resultado de Rf para cromatografía en capa fina del extracto.

	Rf 1	Rf 2	Rf 3	Rf 4	Rf 5	Rf 6	Rf 7
Extracto hidroalcohólico	0,23	0,30	0,36	0,45	0,55	0,60	0,72
Color de mancha	Anaranjado					Amarillo	Anaranjado

De la actividad antioxidante

En el análisis de la actividad antioxidante, para conseguir la lectura de absorbancia corregida se procedió a la resta de la lectura de absorbancia del DPPH con la absorbancia de las muestras, debido al color rojo del extracto hidroalcohólico. De los resultados para la actividad antioxidante mostrados en las tablas 5, 6 y 7, se puede indicar que el extracto hidroalcohólico desecado de la corteza al presentar valor IC₅₀ levemente superior al trolox, posee una capacidad análoga de capturar al radical DPPH.

Tabla 5. Porcentaje de inhibición, de la reacción del trolox con el DPPH.

Promedio absorbancia	Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}$	% Inhibición
0,318	1,0	5,4134
0,254	5,0	24,3506
0,173	10,0	48,5921
0,088	15,0	73,9242
0,006	20,0	98,2154

Tabla 6. Porcentaje de inhibición, de la reacción del extracto hidroalcohólico desecado, con el DPPH.

Promedio absorbancia	Conc. $\mu\text{g}/\text{mL}$	% Inhibición
0,317	1,0	5,6117
0,240	5,0	28,6139
0,153	10,0	54,4914
0,075	15,0	77,6919
0,002	20,0	99,4051

Tabla 7. Comparación del % de inhibición, ecuación de la recta, coeficiente de correlación, IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$), del extracto y el trolox.

Parámetro	<i>Triplaris americana</i> L.					Trolox				
	1	5	10	15	20	1	5	10	15	20
% inhibición	5,61	28,6	54,5	77,7	99,4	5,41	24,4	48,6	73,9	98,2
Ecuación	$y = 4,9210 x - 2,9684$					$y = 4,9012 x - 0,1067$				
Coefficiente de correlación	0,9985					0,9999				
IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	9,5498					10,0543				

De la toxicidad aguda a dosis límite

La administración de una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal no provocó muerte de los animales o síntomas indicativos de toxicidad. La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado (tablas 8 y 9).

Tabla 8. Evolución de la masa corporal de los animales, en función del tiempo.

Tratamiento	Grupo experimental	Masa corporal (g/ rata)			
		Día 1 X 1	Día 7 X 7	Día 14 X 14	Diferencia X 14 – X 1
Extracto hidroalcohólico	Ratas machos	194,6	216,4	235,4	40,8
	Ratas hembras	191,8	206,0	226,8	35,0
Control (agua)	Ratas machos	195,2	212,2	238,4	43,2
	Ratas hembras	189,8	209,0	230,4	40,6

Tabla 9. Rango de masa corporal con relación a la edad en semanas de la especie y línea del modelo biológico.

Edad (semanas)	Masa corporal (g/ rata)
7-8	180-200
8-9	200-220
9-10	220-240

CONCLUSIONES

- El estudio del extracto hidroalcohólico de la corteza *Triplaris americana* ha comprobado la presencia de carbohidratos, heterósidos, compuestos fenólicos: taninos y flavonoides.
- Igualmente, dicho extracto disuelto en agua desionizada pasteurizada a 80° C, posee actividad antioxidante con IC₅₀ de 9,5498 ug/mL.
- En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron signos indicativos de toxicidad en los animales. La toxicidad de los extractos de estudio se encuentra por encima de 2000 mg/kg de masa corporal, calificándose según el Sistema Global Armonizado, como “no clasificadas” (“no tóxicas”).

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a la Mg. Arilmí Gorriti, QF. Moisés García, QF. Gloria Gordillo y QF. Andrés Revilla, docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por la asesoría y orientación brindada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mostacero, L.; Mejía, F.; Gamarra, O. Taxonomía de las Fanerógamas útiles del Perú. CONCYTEC. Volumen I. Editora Normas Legales S.A.C. Trujillo. 2002.
2. Desmarchelier, C.; Alonso, J. Plantas Medicinales para la atención primaria en la salud. Vademécum de Fitoterapia. PRODAPP. Lima. 2005.
3. Desmarchelier, C; Witting, F. Sixty Medicinal Plants from the Peruvian Amazon: Ecology, Ethnomedicine and Bioactivity. Primera edición. Ediciones PROTERRA. Lima. 2000.

4. Miranda, M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ciudad de la Habana. 2002.
5. Gibaja, S. Guía para el análisis de los compuestos del carbono. UNMSM. Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones. Editorial UNMSM. Lima. 1977.
6. Gorriti, A.; Jurado, B.; Quispe, F. Manual de Laboratorio I y II. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Lima. 2004.
7. Lock, O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Primera edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica. Lima. 1994.
8. Randerath, K. Cromatografía en Capa Fina. Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo VIII. 2ª Edición. Editorial Urmo, S.A. Bilbao. España. 1970.
9. Chávez, J.; Chire, T.; Loayza, L. Capacidad antioxidante de compuestos bioactivos. Principios bioactivos de plantas andinas y amazónicas del Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. 2007.
10. CIBN (Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición). Capacidad atrapadora de radicales libres. Primer Curso Nacional Teórico Práctico: Antioxidantes en Recursos Fitoterapéuticos. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2006.
11. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 423, 2000 [Revised Draft Guideline October 2000]. URL disponible en: <http://www.oecd.org>
12. Carreño, M.; Rojas, L. Farmacología experimental pre-clínica. Un método de aprendizaje de la Farmacología para el estudiante. Primera parte. Cátedra de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. 2005.