

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 79 N° 1
ENERO - MARZO 2013



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2011 - marzo 2013)

Presidenta	: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo
Past Presidente	: Juan José León Cam
Vice-Presidente	: Dr. Emilio Guija Poma
Secretario General	: Ing. Quím. Manuel Otiniano Cáceres
Tesorera	: Ing. Quím. Ana María Osorio Anaya
Secretaria del Consejo	
Directivo	: Quím. María Angélica Best de Rodríguez
Directora de Biblioteca	: Quím Farm. Gabriela Soriano Chávez
Director Administrativo	: Quím. Neptalí Ale Borja
Vocales	: Dr. José Juárez Eyzaguirre
	: Quím. Lucía Mondragón Hernández
	: Dra. María Luisa Castro de Esparza
	: Dra. María del Rosario Sun Kou
	: M. Sc. Jorge Eduardo Loayza Pérez
	: M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez
	: Quím Farm. Nora Herrera Hernández
	: Mg. Patricio Muñoz Huillcas

Comisión de Economía y Finanzas

Presidente: Dr. José Amiel Pérez

Comisión de Publicaciones

Presidenta: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidenta: M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez

**INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

LABORATORIO DANIEL ALCIDES CARRIÓN S.A.
UNIÓN DE CERVECERÍAS PERUANAS BACKUS & JHONSTON S.A.
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA - UNMSM
UNIVERSIDAD NORBERT WIENER

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

(Rev Soc Quím Perú)

ISSN 1810 - 634X

Revista Trimestral

Comité Editor

Presidenta : Ana María Muñoz Jáuregui

Editor en Jefe : Luis Valles Fernández

Miembros : Ana Valderrama Negrón
Julio Santiago Contreras

Comité Consultivo

Beyer, Lothar

Universidad de Leipzig - Alemania

Calvo Buendía, Eduardo

Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú

García Herbosa, Gabriel

Universidad Burgos - España

Gamboa Fuentes, Nadia

Pontificia Universidad Católica del Perú

Guija Poma, Emilio

Universidad Científica del Sur - Perú

Muñoz Jáuregui, Ana María

Universidad San Martín de Porres

Lock Sing, Olga

Pontificia Universidad Católica del Perú

Santiago Contreras, Julio

Facultad de Quím. e Ing. Quím.

UNMSM - Perú

Angulo Cornejo, Jorge

Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú

Korswagen Ederi, Richard

Pontificia Universidad Católica del Perú

Picasso, Gino

Universidad Nacional de Ingeniería - Perú

Rueda Sánchez, Juan Carlos

Pontificia Universidad Católica del Perú

Rabinovich Jaitin, Daniel

University of N. Carolina, USA

Troncoso Corzo, Luzmila

Facultad de Medicina UNMSM - Perú

Gutiérrez Correa, Marcel

Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú

Guzmán Duxtán, Aldo

Facultad de Quím. e Ing. Quím. UNMSM - Perú

Alarcón Cavero, Hugo Arturo

Facultad de Ciencias. UNI - Perú

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex
Licenciada en EBSCO

Sede: Av. Nicolás de Araníbar 696 Santa Beatriz – Lima 01

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 472-3925 Fax: (511) 265-9049

e-mail: revsqp@gmail.com / sqperu@gmail.com

Portal web: www.sqperu.org.pe

Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú

Certificado N° 95-1567

Vol 79

ENERO - MARZO 2013

N°1

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

CONTENIDO
(Vol 79 N° 1 - 2013)

- Editorial	1
Trabajos originales	
- Purificación y caracterización bioquímica de un factor de difusión presente en el veneno de la serpiente <i>Bothrops atrox</i> (jergón), por Édgar González, César Ortiz, Gustavo Sandoval, Fanny Lazo, Julio Delgadillo, Edith Rodríguez, Ruperto Severino y Armando Yarlequé.	3
- Compuestos fenólicos y actividad antioxidante <i>in vitro</i> de 6 plantas peruanas, por Víctor Hugo Doroteo, Camilo Díaz, Cecilia Terry y Rosario Rojas.	13
- Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de un extracto oleoso de poro (<i>Allium ampeloprasum</i> Var. porrum), por Rosa María Dávila - Márquez, Raúl Ávila Sosa-Sánchez, Addi Rhode Navarro – Cruz, Viridiana Téllez – Ruiz, Martín Álvaro Lezcano – Hernández.	21
- Análisis proximal, antinutrientes, perfil de ácidos grasos y de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de <i>sacha inchi</i> (<i>Plukenetia volubilis</i> y <i>Plukenetia huayllabambana</i>), por Candy Ruiz, Camilo Díaz, José Anaya, Rosario Rojas.	29
- Efecto <i>in vitro</i> de cromo (VI) sobre un biomarcador tumoral p53 y daño al ADN en hepatocitos murinos, por Pavel Delgado Sarmiento, Corina Vera Gonzales y Carlos Arenas Chávez.	37
- Estudio nutricional de <i>Plukenetia huayllabambana</i> sp nov, por Ana María Muñoz Jáuregui, Carlos Alvarado – Ortiz Ureta, Benjamín Castañeda Castañeda, Edy Barnett Mendoza, Luis Cárdenas Lucero, Emma Manco Cespedes.	47
- Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (<i>Cynara scolymus</i> L.), por Martín Cruzado, Ana Pastor, Nino Castro y Juan Carlos Cedrón.	57
- Valor nutricional de la larva de <i>Rhynchophorus palmarum</i> L.: comida tradicional en la Amazonía peruana, por Gabriel E. Vargas, Giovana Espinoza, Candy Ruiz y Rosario Rojas. ...	64
- Polimerización de compuestos antociánicos presentes en el colorante de la hierba santa (<i>Cestrum hediondinum</i> D.) y prueba de adsorción de iones aluminio (III), por Rossana Georgina Juárez Montiel, Nilda Pinto Apaza, y Teresa Cano de Terrones.	71
Enseñanza de la Química	
- Espectrómetro para radiación visible en casa, de bajo costo y altas prestaciones, por Eduardo Montoya Rossi, Óscar Baltuano Elías, Aurelio Arbildo López.	80
INFORMACIONES	
A. De la Sociedad Química.	92
B. Otras informaciones.	96

Revista Arbitrada

Derechos Reservados : Prohibido el uso total o parcial del material de esta Revista sin indicar la fuente de origen.

Nota: Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta preferentemente los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como, los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las “Instrucciones para los autores”, la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

Los artículos de investigación son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

Las comunicaciones cortas son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidos a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

Las cartas al editor son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

Los trabajos de revisión se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

Los artículos de enseñanza de la química son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad.

Las notas informativas corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos impresos y en formato electrónico (disco compacto o al correo electrónico sqperu@gmail.com) a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 dólares por concepto de gastos administrativos, como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago de las siguientes sumas:

Cuando todos los autores son socios: S/. 120,00

Cuando todos los autores no son socios: S/. 200,00

Si entre los autores hay socios y no socios: S/. 150,00

Si los autores residen en el extranjero US \$ 110,00

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, S/. 30,00 por cada autor en exceso.

Si el trabajo es enviado del extranjero, será US \$ 15,00 más por cada autor en exceso.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará después de la segunda, un mínimo de S/. 30,00.

The publication of each work is subject to payment of the following ones:

When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/. 120,00

When all the authors are not partners: S/. 200,00

If among the authors there are partners and non partners: S/. 150,00

If the authors reside abroad US \$ 110,00

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US \$ 15,00 for each author in excess.

Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico sqperu@gmail.com

1. El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 2, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción "justificar"). Los decimales deben llevar coma.
2. Los idiomas de publicación son español e inglés.
3. El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico después de la dirección postal completa de su institución.
4. Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (Abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con tamaño de fuente 12 y en negrita.).
5. Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos de género y especie van en cursiva (itálica).
6. El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.
7. Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábica seguido de punto. A continuación se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.
9. Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y List of Journals Indexed in Index Medicus. (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

Editorial

"Año Internacional de la Quinua"

Las excepcionales cualidades nutricionales y adaptabilidad en los diferentes pisos ecológicos, hace de la quinua un alimento con gran potencial en la lucha contra el hambre y la desnutrición; es así como el gobierno del Estado Plurinacional de Bolivia lleva la propuesta de "El Año Internacional de la Quinua", con el apoyo de Argentina, Azerbaiyán, Ecuador, Georgia, Honduras, Nicaragua, Paraguay, Perú y Uruguay, con el respaldo de la FAO, siendo aprobado por la Asamblea de las Naciones Unidas en Diciembre de 2011.

En nuestro país los principales departamentos productores de quinua son Puno, Ayacucho, Cusco, Junín, Apurímac, Arequipa y Huancavelica, en tanto que la mayor parte de la producción se destina al mercado interno.

En los últimos años la siembra y cultivo de quinua se han incrementado sustantivamente; en el año 2011 se sembró 35,500 hectáreas con lo que se logró una oferta nacional de 41,200 toneladas de quinua. Ese mismo año Perú logró exportar quinua a 36 países por un total de 25 millones de dólares y un volumen de 7,600 toneladas.

La quinua es fuente de proteínas de muy buena calidad. La calidad nutricional del grano es importante por su contenido y calidad proteínica, siendo rico en los aminoácidos lisina y azufrados, mientras que, las proteínas de los cereales son deficientes en estos aminoácidos. La proteína de la quinua cubre los requerimientos de aminoácidos esenciales, llena los requerimientos de proteínas o nitrógeno total del adulto, y aporta también las cantidades requeridas de cada uno de los aminoácidos esenciales más limitantes para síntesis de proteína tisular en el organismo. Además, presenta un balance adecuado de aminoácidos esenciales, elevada lisina en sus semillas y hojas, buen contenido de vitaminas, alto contenido de calcio, fósforo y hierro, así como que se puede utilizar durante todo el ciclo de la planta.

Es necesario reforzar la cooperación existente entre instituciones de investigación de los países andinos y la FAO, puesto que, la demanda de alimentos es creciente y se requiere con urgencia producir alimentos de calidad, altamente nutritivos y sanos como es la quinua.

Existe un plan de actividades relacionadas con la conmemoración del Año Internacional de la Quinua 2013, tanto en el exterior como la realización del IV Congreso Mundial de quinua del 8 al 12 de julio ha realizare en Ibarra, Ecuador. En el Perú, para revalorar al cereal andino, se contempla la elaboración del Plan Estratégico Nacional de la Quinua y granos andinos al año 2021, la preparación del libro de la quinua a cargo de un equipo científico y la realización del Congreso Nacional de la Quinua, en el tercer trimestre del 2013.

Es necesario contar con la participación del sector público y privado de tal manera que se pueda resaltar la importancia de las cualidades y beneficios de la quinua, que conlleva a un desarrollo sostenido de este grano y, que aporta al desarrollo, seguridad alimentaria y nutrición del país.

Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UN FACTOR DE DIFUSIÓN PRESENTE EN EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox* (JERGON)

Édgar González, César Ortiz¹, Gustavo Sandoval¹, Fanny Lazo¹, Julio Delgadillo¹, Edith Rodríguez¹, Ruperto Severino² y Armando Yarleque^{1*}

RESUMEN

Se ha purificado un componente proteico de alto peso molecular del veneno de la serpiente peruana *B. atrox*, usando una cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 y una filtración molecular sobre Sephadex G-50, utilizando en ambos casos buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0. El análisis enzimático mostró que se trata de una proteína con actividad de hialuronidasa la cual fue purificada 145 veces con un rendimiento de 72% y una recuperación de proteína activa de 0,5%. La enzima registró un peso molecular de 110 kDa por PAGE-SDS, en condiciones reductoras y no reductoras. Los ensayos de estabilidad indicaron que la hialuronidasa perdió el 60% de su actividad después de 150 horas a pH 5,0 y fue rápidamente inactivada por tratamiento térmico mayor a 40 °C. El pH óptimo de la enzima fue de 6 y la proteína sólo mostró actividad sobre ácido hialurónico y no sobre condroitin sulfato. Los ensayos con inhibidores, tales como TLCK, yodoacetato y dexametasona 5mM, produjeron pérdida de la actividad equivalentes a 60, 40 y 75%, respectivamente, en tanto que el tratamiento con suero sanguíneo humano la inactivó totalmente. Asimismo, las pruebas en placa de hemólisis conteniendo ácido hialurónico mostraron que la enzima es capaz de incrementar el área hemolítica. Adicionalmente, la preincubación de la enzima con los antivenenos comerciales lachésico y botrópico, así como el antiveneno experimental botrópico IgY, revelaron una elevada capacidad inhibitoria de tales antivenenos.

Palabras clave: Veneno, serpiente, Amazonía, ácido hialurónico, enzima, antiveneno

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A SPREADING FACTOR FROM THE VENOM OF SNAKE *Bothrops atrox* (JERGON)

ABSTRACT

A protein of high molecular weight was purified from the venom of *Bothrops atrox* Peruvian snake, using DEAE Sephadex A-50 anion exchange chromatography and Sephadex G-50 gel molecular filtration, with 0,05M ammonium acetate, pH 5.0. It showed hyaluronidase activity, and was obtained until homogeneous state with a 145-fold, 72% of yield and a 0.5% of recovery of active protein. The enzyme showed a molecular weight of 110 kDa by SDS-PAGE under reducing and non reducing conditions. The stability assays indicated that hyaluronidase lost 60% of its activity after 150 hours at pH 5.0 and it was quickly inactivated

¹ Lab. Biología Molecular-Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM

² Lab. Zoología de Invertebrados-Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM

* ayarleque48@gmail.co

by heat treatment above 40 °C. The optimum pH was 6.0 using hyaluronic acid and some inhibitors such as TLCK, iodoacetate and dexamethasone (5 mM), caused 60, 40 and 75% of inactivation, respectively. On the other hand, this enzyme is capable to increase hemolysis into agar plates. Furthermore, treatment of the enzyme with human blood-serum, as well as lachesic and bothropic commercial antivenoms produced a strong inhibition; also, IgY experimental antivenom revealed high inhibition of this enzyme.

Key words: Venom, snake, Amazon, hyaluronic acid, enzyme, antivenom.

INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico es un polisacárido multifuncional de alto peso molecular encontrado en todo el reino animal. Especialmente en la matriz extracelular de tejido conectivo blando¹; este componente participa en procesos vitales, tales como: fecundación, reproducción, envejecimiento, comunicación celular y formación de tumores².

Aun cuando la información sobre estas enzimas en los venenos de serpientes es todavía limitada, se sabe que su mayor actividad está relacionada a los vipéridos de gran tamaño como *Lachesis muta* y que ella jugaría un importante rol en la difusión del complejo tóxico que es el veneno³. En cuanto a *B. atrox*, siendo la especie ofídica más peligrosa en el Perú, el estudio de la actividad hialuronidasa reviste gran importancia por sus implicancias en salud pública⁴.

Las hialuronidasas aisladas hasta la fecha proceden de serpientes de las familias Viperidae y Elapidae, y también de artrópodos como arañas; esta enzima presenta algunas características semejantes tales como actividad máxima a un pH ácido y un punto isoeléctrico elevado pero presentan en contraste, propiedades variables, tales como su peso molecular, composición de carbohidratos y sobre todo, su estabilidad. Siendo una hidrolasa del ácido hialurónico, en algunos casos se ha demostrado su participación activa en la difusión del complejo tóxico.

Sin embargo, la poca información existente está relacionada principalmente con su inestabilidad y el bajo porcentaje contenido en el veneno, menor o igual a 1,5%. Siendo esta enzima parte del complejo tóxico, su intervención en el mecanismo de envenenamiento estaría ligado a la penetración de la politoxina en los tejidos de la presa o víctima debido a la hidrólisis del mucopolisacárido, por lo que su estudio reviste importancia, tanto en salud pública como herramienta de diagnóstico, y en la utilidad tecnológica que podría derivarse del conocimiento amplio de este grupo de proteínas.

Por tanto, el objetivo de esta investigación fue desarrollar un método rápido y efectivo para obtener la enzima y poder caracterizarla.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Veneno. Se obtuvo las muestras de veneno de ejemplares adultos de *B. atrox* procedentes de Pucallpa, departamento de Ucayali y mantenidos en el Serpentario "Oswaldo Meneses" de la UNMSM. El veneno extraído por presión manual fue liofilizado y conservado a 4 °C hasta su uso. Para ensayos comparativos se utilizó también el veneno liofilizado de la serpiente *Lachesis muta* de la misma zona, obtenido del mismo modo antes descrito.

Antivenenos. Para el ensayo de inhibición enzimática se utilizó los sueros antibotrópico y antilaquésico al estado líquido, preparados por el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú). Asimismo, se empleó un antiveneno experimental de origen aviar desarrollado en este laboratorio, que contienen inmunoglobulinas IgY contra los venenos de *B. atrox* y *L. muta*⁵.

Cuantificación de proteína

Se determinó midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm y por el método de Lowry *et al*, modificado por Loayza *et al*⁶, usando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Actividad enzimática

Fue calculada por el método turbidimétrico de Di Ferrante⁷. La mezcla de reacción fue 0,1 mg de ácido hialurónico de cordón umbilical humano en 0,5 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M, conteniendo NaCl 0,15 M pH 5,0 y 50 µL de la enzima. Luego de 15 minutos de incubación a 37 °C se adicionó 2 mL de reactivo de BCTA (bromuro-cetil-trimetil-amonio) al 2% en NaOH al 2,5%. Finalmente, se midió la actividad a 400 nm. La actividad fue expresada en unidades Di-Ferrante (UDF) la cual se define como la cantidad de proteína requerida para reducir la turbidez inicial del sustrato en un 50%.

Estabilidad del veneno

Se preparó baterías que contenían veneno de *B. atrox* a diferentes pH usando buffer acetato de amonio 0,1 M pH 4,0, 5,0 y 6,0; así como buffer Tris HCl 0,1 M pH 7,0. Las muestras se colocaron a temperatura ambiente (20 °C) midiéndose la actividad desde cero a 160 horas en presencia de cloruro de sodio 0,15 M y 0,3 M, respectivamente. La actividad enzimática fue estimada en este intervalo de tiempo.

Purificación de la enzima

Fue llevada a cabo tomando como base el método desarrollado por Hurtado *et al*⁸, para el cual, 100 mg de veneno crudo fueron aplicados a una columna de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 (46 x 1,7 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0. Se colectó fracciones de 2 mL a un flujo de 4 mL/hora midiéndose en cada una, la cantidad de proteína y la actividad de la enzima. Las fracciones que mostraron mayor actividad fueron mezcladas y se aplicaron a una columna de Sephadex G-50 (70 x 0,7 cm) con el mismo buffer, colectándose fracciones de 1 mL a un flujo de 4 mL/hora.

Peso molecular

Se calculó mediante PAGE-SDS usando el método de Laemmli⁹, para lo cual se empleó una cámara electroforética vertical sobre geles de poliacrilamida en presencia y ausencia de mercaptoetanol. Como proteínas estándar se usó: albúmina bovina (66kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Inhibidores enzimáticos

Se ensayó el efecto de EDTA, PMSF, TLCK, dexametasona y 2-mercaptoetanol a concentraciones de 1 a 5 mM. Luego de pre incubar la enzima con cada uno de los agentes por 5 minutos, se corrió la reacción enzimática.

Estabilidad enzimática al pH

Se procedió a pre incubar la enzima 5 minutos a 37 °C con cada uno de los buffers a la concentración de 0,1M: citrato de sodio pH 3,5; acetato de amonio pH 4,0 y 5,0; Tris-HCl pH 6,0, 7,0 y 8,0. Luego de la pre-incubación se procedió a medir la actividad de la enzima.

Efecto difusor de la hialuronidasa en ensayos de hemólisis

Se empleó una variación del método de Da Silva y Gulmerme¹⁰. Se colocó en placas Petri estériles (3,5 cm x 10 mm) mezclas de agarosa 1,5%, glóbulos rojos humanos lavados 3%, emulsión de yema de huevo 3% y ácido hialurónico 10 mg/mL en buffer fosfato 0,1 M más NaCl 0,15 M a pH 7,4, dejándose enfriar y gelificar. Luego, se realizó orificios de 4 mm de diámetro en los cuales se aplicaron 20 µL de las muestras: 20 µg veneno crudo, 20 µg de veneno precalentado por 15 min a 60 °C y una mezcla de 20 µg veneno crudo precalentado con

5 μg de hialuronidasa purificada. Las muestras se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente por 12 horas, luego de lo cual se calculó el área del halo hemolítico formado.

Inhibición por antivenenos ofídicos

Se preparó mezclas con la enzima purificada y concentraciones variables de los antivenenos lachésico y botrópico (INS, Lima-Perú) o con los antivenenos experimentales obtenidos de huevos de gallinas inmunizadas⁵ contra venenos de *L. muta* y *B. atrox*, respectivamente. Así también, se hicieron mezclas con suero sanguíneo humano siguiendo el mismo protocolo. Luego de 30 minutos de pre-incubación a 37 °C, se procedió a medir la actividad enzimática remanente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estabilidad enzimática en el veneno

La actividad hialuronidasa mostró estabilidad a pH 5,0 manteniéndose el 70% de la actividad luego de 156 horas a temperatura ambiente; en tanto que a pH 6,0 se detectó sólo el 27%. a pH 4,0 y 7,0 se inhibió totalmente la actividad luego del tiempo mencionado. Por su parte, se observó un efecto adverso de las distintas concentraciones de NaCl donde a 0,15 y 0,3 M la actividad se redujo en 68 y 84%, respectivamente. En contraste, a tiempo cero las mismas concentraciones aumentaron la actividad en 15 y 18%, respectivamente.

Purificación de la enzima

Las figuras 1 y 2 muestran los perfiles proteicos obtenidos al fraccionar el veneno de *B. atrox* con DEAE Sephadex A-50 y Sephadex G-50, respectivamente. En el primer paso se observa la aparición de la enzima en el segundo pico de proteína y en el volumen isocrático, mientras que, en la filtración molecular la enzima se localiza entre los dos primeros picos. La purificación obtenida fue de 145 veces con un rendimiento de 72% y se recuperó el 0,5% de proteína activa (tabla 1). Asimismo, el peso molecular de la hialuronidasa fue calculado en 110 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, usando PAGE-SDS.

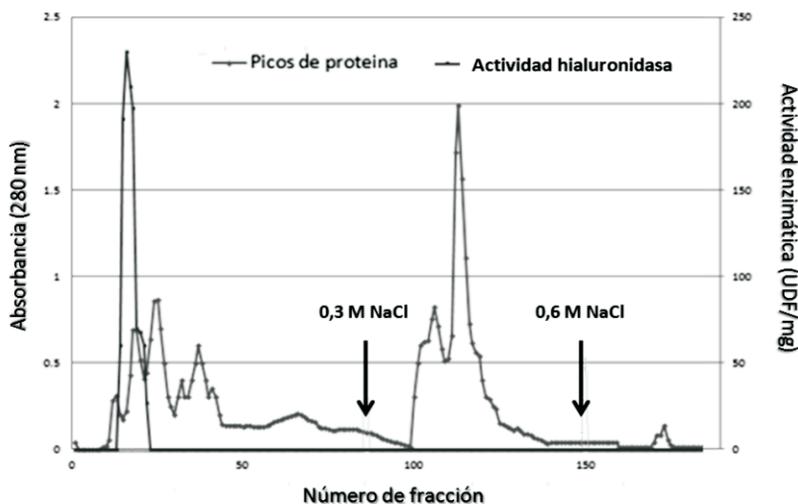


Figura 1. Perfil proteico del veneno de *B. atrox* luego de su pasaje por la columna de DEAE Sephadex A-50. El factor difusor en estudio se localiza principalmente en el segundo pico.

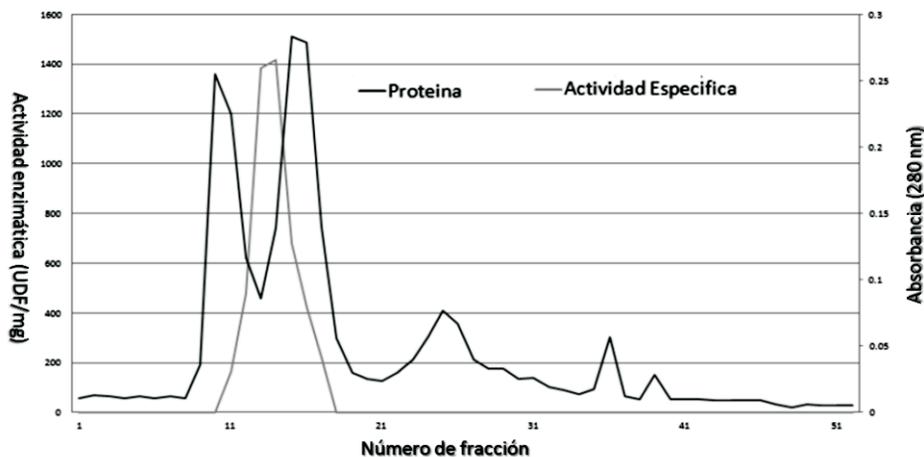


Figura 2. El segundo paso cromatográfico consistió en el uso de una columna de filtración sobre Sephadex G-50.

Tabla 1. Cuadro de purificación de la hialuronidasa del veneno de *B. atrox*

Paso	Cantidad proteína		Actividad específica	UTA	Purificación	Rendimiento %
	mg	%				
Veneno	100	100	8	800	1	100
Sephadex DEAE A50	2	2	200	400	25	50
Sephadex G-50	0,5	0,5	1157	578,5	145	72

Las hialuronidasas pertenecen al E.C. 3.2.1.35 de acuerdo a la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZY). Éstas activan los enlaces glicosídicos β -1,4 del ácido hialurónico en forma aleatoria en un proceso no endolítico, produciendo tetrasacáridos como producto final de la reacción¹¹.

La hialuronidasa del veneno de *B. atrox* es una enzima inestable a juzgar por los datos obtenidos. Esto también fue reportado por Hurtado *et al* (2007)⁸ para la serpiente *Lachesis muta* y en el caso de la enzima del lagarto *Heloderma horridum horridum*¹²; asimismo, existen reportes de la inestabilidad de la actividad de hialuronidasa de serpientes asiáticas¹³. Este panorama, al extrapolarlo a la acción de la enzima durante el envenenamiento, permite establecer la probabilidad de que la enzima, al ser un factor iniciador, tenga elevada actividad y una pobre estabilidad en el tiempo, ya que su efecto sólo sería necesario en la primera etapa del proceso, al actuar el veneno sobre el tejido cercano a la mordedura y su ulterior

inactivación al ingresar al sistema circulatorio por efecto de proteínas séricas de la familia inter-alfa-inhibidores.

El aislamiento de la hialuronidasa presente en el veneno de *B. atrox*, permitió una purificación de 145 veces, con un rendimiento de 72%, en comparación con la enzima aislada de *Agkistrodon contortrix contortrix*, donde se obtiene una purificación de 277 veces con un rendimiento del 16,6%, empleándose en ese caso Sephacryl S-200 HR y CM Sephadex C-25. Cabe mencionar que en el 2004, Girish *et al*¹⁴ obtienen una purificación de 33 veces con un rendimiento de 5% para la NNH1 y 27 veces con un rendimiento de 0,35% para la NNH2, ambas hialuronidasas presentes en el veneno de *Naja naja*, mediante el empleo de Sephadex G-75 y CM Sephadex C-25. Es interesante señalar que, en la presente investigación, el rendimiento, después del primer paso, fue de 50% y se incrementó a un 72% después del segundo paso, lo que sugiere la existencia de un inhibidor que podría estar desligándose de la hialuronidasa en este último paso. Esto no se observa en los trabajos mencionados para *A. contortrix contortrix* y *N. naja* y tampoco en la purificación presentada por Lerma en el 2006³ para la hialuronidasa del veneno de *L. muta*³. Por otro lado, la enzima purificada mostró un peso molecular de 110 kDa usando PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras. Al respecto encontramos un amplio rango de pesos moleculares para hialuronidasas, ya que, para el vípérito *L. muta* se indica un peso de 47 kDa⁸, mientras que Lerma³ reportó 65 kDa para el mismo veneno; a su vez, Cevallos¹⁵ mediante zimogramas en geles de acrilamida determina un peso de 115 kDa para *L. muta*, 137 y 113 kDa para *B. asper*, 73 y 108 kDa para *Crotalus basiliscus*. Adicionalmente, Kudo y Tu¹⁶, encuentran un peso de 59,3 kDa para *A. contortrix contortrix*, mientras que, la enzima de *A. acutus* presenta un peso molecular bajo de 33 kDa (Xu *et al*, 1982). Esto nos indica la gran variabilidad de formas moleculares para esta enzima.

Inhibidores enzimáticos

El empleo de la dexametasona (5 mM), produjo una inhibición del 75% mientras que, el TLCK, el EDTA y el iodoacetato a la misma concentración, produjeron una inhibición de 60, 48, y 39%, respectivamente. En contraste, el 2-mercaptoetanol y el PMSF no ejercieron ningún efecto inhibitorio (tabla 2).

Tabla 2. Cromatograma (1) GC-FID-EAD del extracto glandular de *C. corruda* (hembras)

Agente	Concentración final	Actividad (%)
HA-Ba	-	100
Suero	20 mg/mL	0
Dexametasona	9,8 mM	11
EDTA	5 mM	52
2-Mercaptoetanol	3,15 mM	98
Yodoacetato	5 mM	63
PMSF	6,8 mM	92
TLCK	5 mM	40

Determinación del pH óptimo y estabilidad al pH

La enzima purificada mostró actividad máxima en el rango de pH 4,0 a 7,0 en buffer acetato de amonio, siendo su valor más alto el registrado a pH 6,0 en presencia y ausencia de NaCl 0,15 M. Sin embargo, la enzima preparada en buffer acetato de amonio a pH 6,0 en presencia y ausencia de NaCl 0,15M sólo mantuvo su actividad hasta las 48 horas, en tanto que, cuando estuvo expuesta a pH 5,0 en las mismas condiciones, su actividad remanente fue de 60% en el mismo lapso de tiempo (tabla 2). De estos resultados, es fácil colegir que existen varios inhibidores para esta enzima, lo cual sugiere que es posible inhibirla, por lo menos parcialmente, usando alguno de los ya indicados.

Es interesante señalar que los inhibidores pueden ser herramientas de gran utilidad para el diseño de mejores métodos del tratamiento antiofídico, mediante la neutralización de estas enzimas como lo demuestran los inhibidores de la hialuronidasa reportadas en la presente investigación. La dexametasona, por ejemplo, podría emplearse en el tratamiento de mordeduras, reduciendo las lesiones dérmicas y mejorando la recuperación de los pacientes así como la eficiencia de los sueros anti-ofídicos.

En relación con el pH podemos indicar que la mayoría de las hialuronidasas investigadas tienen un rango de pH entre 5,0 y 6,5, puesto que a pH mayores o menores se inactiva rápidamente. Asimismo, en este caso se observa que, si bien es cierto el NaCl 0,15M eleva la actividad, la estabilidad de la enzima es menor, ya que en 48 horas se inactiva, mientras que en ausencia de esta sal y a pH 5,0 aún se tiene un 60% de actividad.

Valores reportados de pH óptimo para la enzima en otros venenos de reptiles señalan un pH óptimo de 5,0 para el veneno de la serpiente asiática *Agkistrodon acutus*¹⁷, la peruana *Lachesis muta*⁸, las dos isoformas del veneno de la cobra africana *Naja naja*¹⁴ y el lagarto *Heloderma horridum horridum*¹², mientras que, un pH óptimo de 6,0 fue establecido para el veneno de la serpiente *Agkistrodon contortrix contortrix*¹⁶ y pH 5,5 para el veneno de *Bothrops brazili*¹⁸.

Efecto difusor de la hialuronidasa

La prueba de hemólisis en placa causada por la fosfolipasa A₂ del veneno, mostró algunos hechos interesantes. Así, tenemos que el veneno total de *Bothrops atrox* produjo un halo de difusión de 24 mm² (100%), en tanto el veneno inactivo por calor a 60 °C, en el cual está ausente la hialuronidasa, produjo sólo un halo de difusión de 15 mm² (40%). Asimismo, al colocar veneno inactivado por calor más hialuronidasa purificada, se restableció la difusión a un valor de 22 mm² (87%). En cambio con la enzima purificada sólo se registró un halo de difusión de 11mm² (13%). Esto significa que el valor encontrado para el veneno calentado a 60 °C (40%), se debe exclusivamente a la actividad de fosfolipasa A₂. Al adicionarse la enzima purificada al veneno calentado, el halo de hemólisis se incrementa drásticamente, llegando a 87%; es decir, más del doble del halo producido por el veneno calentado.

Reactividad inmunogénica y neutralización

Los ensayos de inmunogenicidad tanto del veneno crudo como de la enzima purificada mostraron lo siguiente: en el caso del veneno crudo, este es capaz de formar varias líneas de precipitación con los antivenenos botrópico y lachésico, respectivamente. De igual manera, la enzima en estudio mostró su reactividad con ambos antivenenos, formándose en cada caso una sola línea de precipitación. Por otro lado, los antivenenos botrópico polivalente y lachésico monovalente (INS), provocaron una reducción del 50% en la actividad enzimática cuando se usaron 192 y 80 µL de suero por mg de veneno, respectivamente; en tanto que al usarse la enzima purificada, los valores de inhibición al 50% fueron 2200 y 200 µL por mg de enzima.

Adicionalmente, los anticuerpos policlonales aviares IgY preparados contra el veneno de *B. atrox*, mostraron una neutralización de la actividad hialuronidasa con una reducción de 50% en la actividad enzimática para una proporción de 1800 μL de IgY por mg de veneno, mientras que aquéllos preparados contra el veneno de *L. muta*, causaron una reducción en este mismo porcentaje, empleándose 400 μL de IgY por mg de veneno. Esta reducción al 50% se logró usándose 7000 μL y 4500 μL de IgY por mg de enzima, respectivamente.

Como puede observarse en todos los ensayos de neutralización, se obtuvo una mayor eficiencia del antiveneno lachésico, tanto comercial de origen equino como experimental de origen aviar, en la inhibición de la enzima en estudio.

Hasta la fecha, no se ha demostrado que las hialuronidasas presenten toxicidad intrínseca¹⁴ pero son potenciadores de la toxicidad del veneno gracias a su papel difusor de los componentes tóxicos^{12,13,17}. Al no poseer toxicidad se ha diseñado métodos que evalúan la actividad potenciadora de la hialuronidasa respecto a otras actividades tóxicas de enzimas conocidas. Así se observa que ellas incrementan la actividad de creatina fosfoquinasa y el daño hemorrágico causado por miotoxinas¹⁴. Por su parte, Lerma en el 2006³, realizó la evaluación de la actividad hemolítica indirecta incluyendo el sustrato de hialuronidasa; es decir, el ácido hialurónico en placas de hemólisis. De acuerdo con ello, se puede observar el efecto difusor de la hialuronidasa en el incremento del halo hemolítico para el veneno crudo y la enzima purificada de *L. muta*, lo que es comparable con el presente trabajo, en el que se utilizó una técnica similar para evaluar el efecto de la hialuronidasa aislada del veneno *B. atrox*.

Por otro lado, los antivenenos o sueros antiofídicos son la forma más eficiente y directa para el tratamiento de mordeduras por serpientes venenosas. Lamentablemente, la mayoría de sueros antiofídicos generan una pobre protección frente al daño del tejido local adyacente a la mordedura¹⁹, por lo que la inhibición de la hialuronidasa no sólo generaría una protección del tejido local adyacente a la zona de la mordedura, sino que, también retardaría la muerte en casos de envenenamiento de alto grado²⁰. Actualmente, los sueros antiofídicos otorgan protección frente a las principales actividades tóxicas responsables de la sintomatología del envenenamiento ofídico²¹, siendo dicha protección más eficiente en el tratamiento de la mordedura de especies del mismo género. Sin embargo, se obtiene una pobre reactividad cruzada (4%) entre los venenos de las serpientes *B. atrox* y *L. muta*²²; en cambio, el grado de neutralización de la actividad hialuronidasa por parte de ambos sueros, frente a la hialuronidasa de *B. atrox*, indicaría que a pesar de la poca reactividad cruzada, ambos sueros son capaces de neutralizar esta enzima. Es interesante señalar también que la neutralización de la actividad hialuronidasa ocurre al emplear sueros aviares; dato importante para el diseño de sueros antiofídicos en gallinas, lo que constituye una nueva tecnología que merece ser evaluada para esta enzima.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran la presencia en el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, de una hialuronidasa, la cual es una proteína básica, homodimérica, con un peso molecular de 110 kDa en condiciones reductoras y no reductoras. Es termolábil, estable en el rango de pH 4,0 a 7,0, con un pH óptimo de 6,0. Posee un efecto difusor que incrementa la hemólisis indirecta “in vitro” y es neutralizada por los sueros antibotrópico polivalente, antilaquésico y los sueros de origen aviar antibotrópico y antilaquésico en dosis variables.

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo agradecen al Consejo Superior de Investigación del Vicerrectorado de Investigación de la UNMSM, por su apoyo financiero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Letters* 1998; 131:3-11.
2. Stern R. Hyaluronidases in cancer biology. *Seminars in cancer biology* 2008; 18:275-280.
3. Lerma L. Evaluación bioquímica y biológica de una hialuronidasa del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. Tesis para al Título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética. UNMSM. 2006.
4. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima Perú: Fondo Editorial UNMSM 2000.
5. Mendoza J, Vivas D, Rodríguez E, Inga R, Sandoval G, Lazo F, Yarlequé A. Eficacia experimental de anticuerpos IgY producidos en huevos, contra el veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2012; 29 (1): 69-75.
6. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Rev Soc Quím Peru* 1985; 52(3): 151-163.
7. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Medical Research* 1955; 303-306.
8. Hurtado L, Lerma L, Rodríguez E, Yarlequé A. Evaluación, aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hialuronato glucanohidrolasa del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* "Shushupe". *Rev Soc Quím Peru* 2007; 73(4): 226-234.
9. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
10. Da Silva M, Gulmerme O. Titration of anti serum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A₂ activity. *Toxicon* 1981; 20: 563-569.
11. Stern R, Jedrzejewski M. The hyaluronidases: their genomics, structure and mechanism of action. *Chem Rev* 2006; 106(3): 818-839.
12. Tu A, Hendon R. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem Physiol B* 1983; 76(2):377-383.
13. Pukrittayakamee S, Warrell D, Desakorn V, Mc Michael A, White N, Bunnag D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon* 1988; 26:629-737.
14. Girish K, Shashidharamurthy S, Nagaraju T, Gowda K, Kemparaju K. Isolation and characterization of hyaluronidase a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie* 2004; 86: 193-202.
15. Cevallos M, Navarro Duque C, Varela-Julia M, Alagon C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 1992; 30: 925-930.
16. Kudo K, Tu A. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 386 (2): 154-162.
17. Xu X, Wang X, Liu X, Huang J, Lu Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon* 1982; 20: 973-981.

18. Delgadillo J. Caracterización bioquímica y biológica de una hialuronato glicanohidrolasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops brazili* “jergón shushupe”. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo. UNMSM. 2012.
19. Lomonte B, Leon G, Hanson L. Similar effectiveness of Fab and F (ab')₂ polyvalent antivenoms do not differ in their ability to neutralize hemorrhage, edema and mionecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 1996; 35: 1627-1637.
20. Girish K, Kemparaju K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: Roles in the management of poisonous bite. *Life Sciences* 2006; 78: 1433-1440.
21. Yarlequé A, Vivas D, Inga R, Rodríguez E, Sandoval G, Pessah S, Bonilla C. Acción del antiveneno botrópico polivalente sobre las actividades proteolíticas presentes en los venenos de serpientes peruanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2008; 25(2): 169-173.
22. Sandoval G, Lazo F, Rodríguez E, Yarlequé A, Zingali R. Identificación molecular y actividad sobre sustratos cromógenos de la venombina A del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*. *Rev Peru biol* 2010; 17(3): 365-370.

COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE 6 PLANTAS PERUANAS

Víctor Hugo Doroteo^a, Camilo Díaz^b, Cecilia Terry^c, Rosario Rojas^{a,b,*}

RESUMEN

Con miras a conocer el potencial de seis plantas peruanas para el desarrollo de fitocosméticos y/o nutraceuticos, en el presente estudio se determinó el contenido de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales; asimismo, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smalanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto). La actividad antioxidante *in vitro* de dichos extractos fue determinada por medio de los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; como también a través de la medición de su poder reductor y actividad antioxidante total. Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los de uña de gato y ratania, lo cual puede deberse a sus altos contenidos de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales.

Palabras clave: antioxidante, DPPH, flavonoides, polifenoles, TEAC

PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY *IN VITRO* OF 6 PERUVIAN PLANTS

ABSTRACT

In order to assess the potential of six Peruvian plants for the development of phytocosmetics and/or nutraceuticals, the ascorbic acid content, flavonoids and total phenolic compounds, as well as antioxidant activities of hydroalcoholic extracts of *Uncaria tomentosa* (cat's claw), *Zea mays* (purple corn), *Smalanthus sonchifolius* (yacon), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) and *Physallis peruviana* (aguaymanto) were evaluated. The *in vitro* antioxidant activities of these extracts were determined by means of DPPH, superoxide and hydroxyl radicals inhibition assays, as well as through the measurement of their reducing power and total antioxidant activity. Hydroalcoholic extracts of cat's claw and ratania showed the highest antioxidant activities, which may be due to their high content of ascorbic acid, flavonoids and total phenolics.

Key words: antioxidant, DPPH, flavonoids, polyphenols, TEAC

INTRODUCCIÓN

El daño oxidativo causado por los radicales libres está relacionado al desarrollo de diversas enfermedades como la aterosclerosis, cáncer, artritis y otras enfermedades inflamatorias.¹

^a Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. rosario.rojas@upch.pe

^b Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

^c 3QPSAC.

Existen diversas sustancias sintéticas como el hidroxianisol butilado (BHA) o el hidroxitolueno butilado (BHT) que son eficientes secuestradores de radicales libres; sin embargo, dichos antioxidantes sintéticos están siendo restringidos porque pueden ser carcinogénicos.^{2,3} Por lo tanto, existe un creciente interés en la búsqueda de antioxidantes de origen natural, especialmente provenientes de plantas medicinales y/o alimenticias. En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de estas plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son potentes secuestradores de especies reactivas de oxígeno y además son capaces de inhibir a enzimas productoras de radicales libres.⁴

El objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales; así como evaluar la actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de 6 plantas peruanas: *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Zea mays* (maíz morado), *Smallanthus sonchifolius* (yacón), *Lepidium meyenii* (maca), *Krameria triandra* (ratania) y *Physallis peruviana* (aguaymanto). Con miras a conocer el potencial de estos productos naturales para el desarrollo de fitocosméticos y/o nutracéuticos, se evaluó su actividad antioxidante *in vitro* por medio de los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; como también a través de la medición de su poder reductor y actividad antioxidante total.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos. Espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis 1240.

Reactivos. 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH), reactivo Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio, cloruro de aluminio, nitrito de sodio, hidróxido de sodio, ácido gálico, quercetina, ácido ascórbico, ácido metafosfórico, 2,6-dicloroindofenol, etanol, 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), persulfato de sodio, Trolox, hexacianoferrato de potasio, ácido tricloroacético, cloruro férrico, nitroazul de tetrazolio (NBT), NADH, metasulfato de fenazina (PMS), fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, desoxirribosa, peróxido de hidrógeno, EDTA, ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, manitol.

Muestras vegetales. Las muestras vegetales fueron colectadas e identificadas por el biólogo Camilo Díaz. Se colectó corteza de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), frutos de *Zea mays* (maíz morado), tubérculos de *Smallanthus sonchifolius* (yacón), hipocótilos de *Lepidium meyenii* (maca amarilla), raíces de *Krameria triandra* (ratania) y frutos de *Physallis peruviana* (aguaymanto).

Preparación de extractos. Las muestras vegetales secas y molidas fueron extraídas con una mezcla de etanol y agua destilada (7:3) por 4 días a temperatura ambiente. Luego de la filtración se procedió a evaporar el solvente en un rotavapor a temperatura menor de 40 °C. Los extractos hidroalcohólicos obtenidos fueron almacenados en la refrigeradora a temperatura menor de 4 °C hasta su uso.

Determinación de compuestos fenólicos. Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por García *et al.*⁵ Se preparó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentración fue de 1-5 mg/L. Los extractos hidroalcohólicos de las 6 muestras vegetales fueron evaluados a una concentración de 0,1 mg/mL. A 100 µL de la muestra se le añadió 250 µL de la solución de Folin-Ciocalteu (diluido 1 en 2 con agua milli-Q), se sonicó por 5 min, luego se le añadió 1250 µL de carbonato de sodio al 20% y 400 µL de agua ultra pura. Se agitó vigorosamente, se cubrió de la luz y se le llevó a reposo por 90 minutos a temperatura ambiente. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro.

Las muestras fueron analizadas por triplicado y el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado en mg de ácido gálico/g de extracto hidroalcohólico.

Determinación de flavonoides. El contenido de flavonoides en los extractos hidroalcohólicos fue determinado mediante el ensayo colorimétrico con AlCl_3 , propuesto por Ivanova et al.⁶ A 0,5 mL del extracto hidroalcohólico (a una concentración de 0,3 mg/mL) se le añadió 2 mL de agua destilada y 150 μL de nitrito de sodio. Se dejó reposar por 5 min y se le añadió 150 μL de cloruro de aluminio. Se dejó reposar por 6 min y se añadió 1 mL de hidróxido de sodio, se mezcló bien y se completó con agua destilada hasta volumen final de 5 mL. Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración de quercetina a concentraciones entre 0,18 a 0,36 mg/mL. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 510 nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como mg de quercetina/g de extracto hidroalcohólico.

Contenido de ácido ascórbico. El contenido de ácido ascórbico fue determinado de acuerdo al método descrito por Lung et al.⁷ Se extrajo 20 mg del extracto hidroalcohólico con 2 mL de ácido metafosfórico al 1% por 45 minutos a temperatura ambiente; al cabo de ese tiempo se filtró. Se tomó 100 μL de la solución anterior y se le agregó 900 μL de una solución de 2,6-dicloroindofenol (cuya absorbancia estaba entre 0,30 y 0,35 para asegurar que la lectura de la muestra se encuentre dentro del rango de las de los estándares), luego de 1 minuto se midió la absorbancia a 515 nm. El contenido de ácido ascórbico se determinó a partir de la recta de regresión obtenida con el ácido ascórbico estándar en las concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Actividad antioxidante en el test de DPPH. Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos mediante el método de Mensor et al.⁸ Se preparó diluciones en etanol acuoso de los extractos hidroalcohólicos hasta obtener concentraciones de 0,0 a 150,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se mezcló 1,0 mL de cada una de las diluciones con 0,5 mL de una solución 0,3 mM de DPPH en etanol y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos; al término de los cuales se procedió a medir la absorbancia de la mezcla a 517 nm. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante de cada muestra de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \left(\frac{AC - AM - AB}{AC} \right) \times 100$$

donde:

AM es la absorbancia de la muestra + DPPH

AB es la absorbancia del blanco (muestra + etanol)

AC es la absorbancia del blanco del reactivo (DPPH + etanol).

La concentración del extracto hidroalcohólico que neutraliza al 50 por ciento de los radicales de DPPH (EC_{50} , concentración efectiva media) se obtiene de la recta obtenida al graficar el porcentaje de actividad antioxidante versus la concentración de la muestra ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Actividad antioxidante total (TEAC). La capacidad antioxidante se determinó siguiendo el método descrito por Hazra et al.⁹ El radical ABTS^+ fue generado al mezclar un volumen de solución 14 mM de ABTS con un volumen de la solución 4,9 mM de persulfato de sodio y se incubó durante 12-16 h en oscuridad, para generar el radical ABTS^+ . La solución del radical ABTS se diluyó con agua hasta obtener una absorbancia de 0,70 ($\pm 0,2$). Se mezcló 10 μL de

los extractos hidroalcohólicos a diferentes concentraciones (0,05 a 10 mg/mL) con 1,0 mL de la solución de radical ABTS y se leyó la absorbancia luego de 6 minutos a una longitud de onda de 734 nm. Se procedió de igual manera para medir la actividad antioxidante del estándar Trolox. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante total (% AAT) mediante la siguiente fórmula :

$$\%AAT = (A_o - A_m) \times 100 / A_o$$

donde:

% AAT = Porcentaje de actividad antioxidante total

A_o = Absorbancia del control

A_m = Absorbancia de la muestra con ABTS – Absorbancia del blanco de la muestra

El blanco consistió de la mezcla de 10 µL del extracto hidroalcohólico con 1,0 mL de agua destilada. El control consistió de la mezcla de 10 µL de etanol con 1,0 mL de la solución de radical ABTS.

Se calculó el porcentaje de inhibición de la formación de radicales ABTS y se graficó como una función de la concentración. Finalmente, se determinó el TEAC (trolox equivalent antioxidant concentration) dividiendo la pendiente de la gráfica de la muestra (extracto hidroalcohólico) sobre la pendiente de la gráfica para el estándar Trolox.

Poder reductor. El poder de los extractos de reducir el ion Fe³⁺ fue determinado mediante el método de Hazra et al.⁹ Diferentes concentraciones (0,0 hasta 0,4 mg/mL) del extracto hidroalcohólico (0,5 mL) se mezcló con 0,5 mL de solución amortiguadora de fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 0,5 mL hexacianoferrato de potasio (0,1%), seguido de incubación a 50 °C en un baño de agua durante 20 minutos. Después de la incubación se añadió 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% para terminar la reacción. Se tomó 1 mL de la solución y se mezcló con 1 mL de agua destilada y 0,1 ml de solución de FeCl₃ (0,01%). La mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 700 nm contra agua destilada como blanco. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. Una absorbancia superior de la mezcla de reacción indica un poder reductor mayor. Se utilizó el ácido L-ascórbico como control positivo.

Inhibición del radical-anión superóxido. La actividad inhibitoria se evaluó usando el método descrito por Gupta et al.¹⁰ Se mezcló 1 mL de nitroblue tetrazolium (NBT) 156 µM (en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4) con 1 mL de NADH 468 µM (en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4) y 0,1 mL del extracto hidroalcohólico o quercetina (a diferentes concentraciones finales entre 20 a 200 µg/mL), se mezcló y añadió 0,1 mL de metasulfato de fenazina (PMS) 60 µM (en buffer fosfato 100 mM, pH 7,4) para iniciar la reacción. La mezcla se incubó a 25 °C por 5 minutos y se leyó su absorbancia a 560 nm. Se realizó de manera similar un control sin muestra y se utilizó a la quercetina como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

El porcentaje de inhibición del anión radical superóxido fue calculado como:

$$\%Inh = (A_o - A_m) \times 100 / A_o$$

donde:

A_o = Absorbancia del control (sin muestra)

A_m = Abs. de la mezcla reaccionante con PMS – Abs. de la mezcla reaccionante sin PMS

Las EC_{50} (concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa representa las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos y la ordenada el promedio de porcentaje de actividad antioxidante obtenido a partir de tres mediciones independientes.

Actividad antioxidante para el radical hidroxilo. La actividad fue determinada de acuerdo al método descrito por Özyürek et al.¹¹ Se mezcló 100 μ L de buffer KH_2PO_4 -KOH (100 mM, pH 7,4), 100 μ L desoxiribosa (15 mM), 50 μ L de ácido ascórbico (1 mM), 50 μ L H_2O_2 (10 mM), 50 μ L de extracto hidroalcohólico (a las concentraciones finales de 5, 15, 25, 35 y 50 μ g/mL), 100 μ L $FeCl_3$ (500 μ M) y 50 μ L EDTA (1mM). La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C por 1 hora. Al final de dicho periodo de incubación se agregó 500 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA, 1% w/v) seguido de la adición de 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA, 2,8% w/v). Las soluciones se pusieron en un baño de agua a 80 °C por 20 minutos para que desarrolle el color rosado del aducto malondialdehído-ácido tiobarbitúrico y luego la absorbancia se midió a 532 nm. Se realizó un control sin muestra y se utilizó al manitol como compuesto de referencia. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se calculó el porcentaje de inhibición de formación de radical hidroxilo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times (A_0 - A_m) / A_0$$

Donde:

A_0 = Absorbancia del control (sin muestra)

A_m = Abs. de la muestra con desoxiribosa – Abs. de la muestra sin desoxiribosa

Las EC_{50} (concentración efectiva media) se calcularon por análisis de regresión lineal, en donde la abscisa representa las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos y la ordenada el promedio de porcentaje de actividad antioxidante obtenido a partir de tres mediciones independientes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 1, en el ensayo de DPPH los extractos más activos fueron los de ratania y uña de gato (EC_{50} = 10,45 y 12,05 μ g/mL, respectivamente), llegando a ser casi tan potentes como el control positivo, el flavonoide rutina (EC_{50} = 6,43 \pm 0.22 μ g/mL).

Similarmente, la capacidad antioxidante total o TEAC (trolox equivalent antioxidant concentration) de los extractos de ratania y uña de gato fueron mayores que la de los otros extractos, llegando a ser del 71 y 47% con respecto a la del control positivo trolox (100%).

Para el test de inhibición del radical superóxido se utilizó como control positivo al flavonoide quercitina (EC_{50} = 41,24 \pm 1,24 μ g/mL). Solamente los extractos de ratania y uña de gato fueron activos en este ensayo (EC_{50} = 66,02 y 124,28 μ g/mL, respectivamente).

Los extractos que mejor inhibieron al radical hidroxilo fueron los de ratania y aguaymanto (EC_{50} = 18,50 y 22,95 μ g/mL, respectivamente), los cuales fueron inclusive más activos que el control positivo manitol (EC_{50} = 39,99 \pm 1,12 μ g/mL) (tabla 1).

Tabla 1. Actividad antioxidante *in vitro* de 6 extractos de plantas

Extractos etanólicos	DPPH EC ₅₀ (µg extracto/mL)	TEAC	Radical superóxido EC ₅₀ (µg extracto/mL)	Radical hidroxilo EC ₅₀ (µg extracto/mL)
Ratania	10,45 ± 0,48	0,71 ± 0,04	66,02 ± 8,06	18,50 ± 0,78
Uña de gato	12,05 ± 0,47	0,47 ± 0,02	124,28 ± 7,16	> 50,00
Maíz morado	28,89 ± 0,81	0,18 ± 0,01	> 200,00	35,02 ± 2,88
Aguaymanto	> 100,00	< 0,01	> 200,00	22,95 ± 3,33
Maca	> 100,00	< 0,01	> 200,00	> 50,00
Yacón	64,52 ± 0,66	0,07 ± 0,01	> 200,00	34,07 ± 2,79

En la figura 1 se observa que existe un efecto dosis-respuesta en el poder de los 6 extractos hidroalcohólicos evaluados de reducir el ion Fe³⁺. A cualquiera de las dosis evaluadas, los extractos con mayor poder reductor fueron los de ratania, uña de gato y maíz morado. A concentraciones mayores de 0,2 mg/mL, los extractos de ratania y uña de gato fueron inclusive más activos que el ácido ascórbico (control positivo).

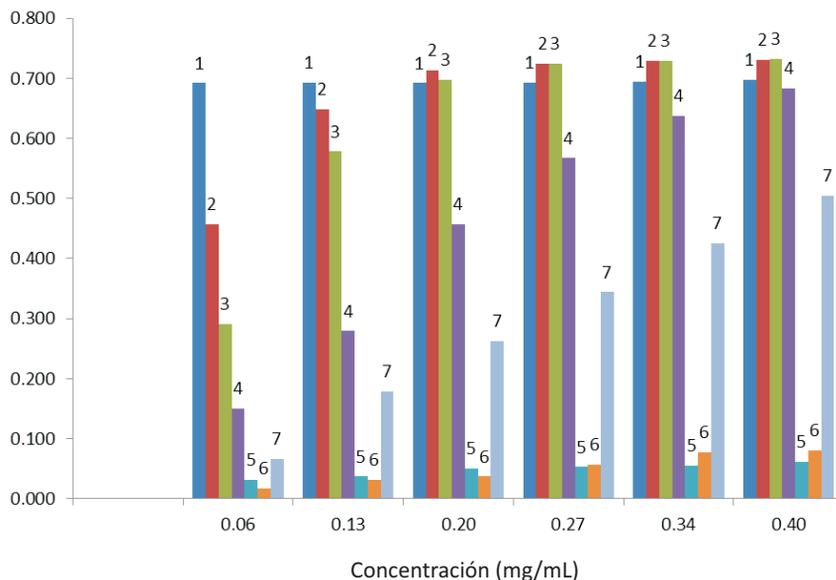


Figura 1. Poder reductor: Comparación de las absorbancias del ácido ascórbico (1) con los extractos de ratania (2), uña de gato (3), maíz morado (4), aguaymanto (5), maca (6) y yacón (7) a diferentes concentraciones (mg/mL)

La alta actividad antioxidante mostrada por los extractos hidroalcohólicos de ratania, uña de gato y maíz morado parece deberse a su gran contenido de sustancias antioxidantes. Estos tres extractos fueron precisamente los que mostraron mayor concentración de ácido ascórbico, flavonoides y compuestos fenólicos totales (tabla 2); que son sustancias con reconocida actividad antioxidante.

Tabla 2. Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides y ácido ascórbico en 6 extractos de plantas

Extractos hidroalcohólicos	Fenólicos totales (mg ác. gálico/g extracto)	Flavonoides (mg quercetina/g extracto)	Ácido ascórbico (mg/100 g extracto)
Ratania	30,1 ± 0,20	127,87 ± 0,02	203,39 ± 6,48
Uña de gato	17,3 ± 0,01	79,39 ± 0,04	304,23 ± 3,93
Maíz morado	33,2 ± 3,40	48,40 ± 0,03	142,86 ± 7,32
Aguaymanto	9,4 ± 0,04	12,72 ± 0,00	< 45,00
Maca	9,3 ± 0,01	14,66 ± 0,00	< 45,00
Yacón	12,8 ± 0,02	27,21 ± 0,00	< 45,00

Una decocción de corteza de uña de gato mostró una alta actividad antioxidante en el test de inhibición de radicales DPPH, hidroxilo y peroxilo. Según Goncalves *et al.*, la actividad antioxidante de la uña de gato se debería principalmente a la alta concentración de proantocianidinas.¹² La capacidad antioxidante de extractos de uña de gato ha sido también demostrada por Pilarski *et al.*, quienes concluyeron que el extracto hidroalcohólico al 50% es más activo que el extracto acuoso en el test de inhibición de radicales superóxido y peroxilo, así como en su capacidad antioxidante total (TEAC).¹³

Carini *et al.* evaluaron el extracto de ratania, estandarizado en su contenido de lignanos, y mostraron que es capaz de proteger a los queratinocitos del daño causado por radiación UV-B.¹⁴ Esta propiedad, en asociación con su alta capacidad antioxidante, hace del extracto de ratania un buen candidato para el desarrollo de bloqueadores de origen natural.

CONCLUSIONES

De las seis plantas evaluadas en el presente estudio, destacan las altas actividades *in vitro* en los ensayos de inhibición de radicales DPPH, superóxido e hidroxilo; poder reductor y actividad antioxidante total de los extractos hidroalcohólicos de corteza de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) y de raíz de *Krameria triandra* (ratania), los cuales muestran un gran potencial para el desarrollo de nutraceuticos y/o fitocosméticos.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo gracias al auspicio del FIDECOM-Innovate Perú (Proyecto 148-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010: Desarrollo y validación científica de ingredientes naturales basados en plantas medicinales y/o alimenticias de la biodiversidad peruana para la industria cosmética).

REFERENCIAS

1. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* **1991**; *91*, 14.
2. Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.* **1983**; *70*, 343.
3. Safer, A.M., Al-Nughamish, A.J. Hepatotoxicity induced by the antioxidant food additive butylated hydroxytoluene (BHT) in rats: An electron microscopical study. *Histol. Histopathol.* **1999**; *14*, 391.
4. Atmani, D., Ruiz-Larrea M.B., Ruiz-Sanz, J.I., Lizcano, L.J., Bakkali, F., Atmani, D. Antioxidant potential, cytotoxic activity and phenolic content of *Clematis flammula* leaf extracts. *J. Med. Plants Res.* **2011**; *5*, 589.
5. García Nava M.J. http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_IUAQGarciaNava.pdf (último acceso 8 de Octubre del 2012).
6. Ivanova, V., Stefova, M., Chinnici, F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. *J. Serb. Chem. Soc.* **2010**; *75*, 45.
7. Lung, M-Y., Chang, Y-C. Antioxidant properties of the edible Basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**; *12*, 6367.
8. Mensor, L., Menezes, F., Leitao, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C., Leitao, S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* **2001**; *15*, 127.
9. Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2008**; *8*, 63.
10. Gupta, M., Kanti Mazumdar, U., Gomathi, P., Sambath Kumar, R. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Ervatamia coronaria* Stapf. leaves. *Iran. J. Pharm. Res.* **2004**; *3*, 119.
11. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Apak, Reşat. Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation. *Anal. Chim. Acta* **2008**; *616*, 196.
12. Gonçalves, C., Dinis, T., Batista, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochem.* **2005**; *66*, 89
13. Pilarski, R., Zieliński, H., Gulewicz, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol.* **2006**; *104*, 18.
14. Carini, M., Aldini, G., Orioli, M., Maffei Facino, R. Antioxidant and photoprotective activity of a lipophilic extract containing neolignans from *Krameria triandra* roots. *Planta Med.* **2002**; *68*, 193.

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN EXTRACTO OLEOSO DE PORO (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*)

Rosa María Dávila-Márquez^{*}, Raúl Ávila Sosa-Sánchez¹, Addí Rhode Navarro-Cruz¹, Viridiana Téllez-Ruiz¹, Martín Álvaro Lazcano-Hernández¹

RESUMEN

Se probó la actividad antimicrobiana de extractos del poro (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) obtenidos por métodos discontinuos (Tintura) y continuos (Soxhlet), empleando la prueba de difusión en agar y cinéticas de crecimiento bacteriano. Los resultados de la prueba de difusión en agar descartaron el extracto alcohólico por no presentar actividad antimicrobiana. En las cinéticas de crecimiento bacteriano se probaron diferentes concentraciones del extracto oleoso logrando la inhibición de *Escherichia coli* (91%), *Staphylococcus aureus* (72%) y *Bacillus cereus* (65%). Se concluye que el extracto oleoso del poro representa un antimicrobiano natural eficaz *in vitro*.

Palabras clave: extracto, tintura, extracto oleoso, cinética de crecimiento bacteriano.

IN VITRO EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF A PORE OIL EXTRACT (*Allium ampeloprasum* Var. *Porrum*)

ABSTRACT

We tested the antimicrobial activity of extracts of the pore (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) obtained by discontinuous method (Dye) and continuous (Soxhlet) using the agar diffusion test and kinetics of bacterial growth. The results of the agar diffusion test ruled out the alcoholic extract it not present antimicrobial activity. In the kinetics of bacterial growth are tested different concentrations of oil extract achieving inhibition of *Escherichia coli* (91%), *Staphylococcus aureus* (72%) and *Bacillus cereus* (65%). We conclude that the oil extract of the pore is a natural antimicrobial effective *in vitro*.

Key words: extract, dye, oil extract, kinetics of bacterial growth.

INTRODUCCIÓN

El uso de agentes químicos para prevenir o retardar el deterioro de alimentos deriva en parte del hecho, que tales compuestos son empleados en el tratamiento de enfermedades del hombre, animales y plantas lo cual no implica que todos los agentes quimioterapéuticos puedan ser empleados como conservadores de alimentos. Por otra parte, hay algunos compuestos químicos empleados en la preservación de alimentos que son inefectivos o tóxicos como quimioterapéuticos. Excepto algunos antibióticos, ninguno de los conservadores de alimentos empleados actualmente, tiene uso quimioterapéutico para personas o animales. Aunque un gran número de compuestos han sido descritos como potenciales conservadores, sólo un pequeño número se han empleado en alimentos debido a las estrictas reglas de seguridad dictadas por la Food and Drug Administration (FDA) o por el

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

^{*} rosamadavila@yahoo.com.mx

hecho que no todos los compuestos que presentan actividad antimicrobiana *in vitro* la conservan al ser adicionados a los alimentos.

Se han aislado alrededor de 12 000 compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen sólo el 10% de los metabolitos secundarios.¹ Probablemente los extractos con poder antimicrobiano mejor caracterizados del reino vegetal son los obtenidos de ajos (*Allium sativum*) y cebollas (*Allium cepa*). Walton y Lovell (1936) indicaron que los agentes volátiles tanto de la cebolla como del ajo inhibían a *B. subtilis*, *Serratia marcescens* y algunas micobacterias en medios microbiológicos. Desde entonces se ha demostrado que el crecimiento y producción de toxinas de muchos microorganismos entre ellos *B. cereus*, *C. botulinum* tipo A, *E. coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp* y *S. aureus*, entre otros, son inhibidos por el ajo y la cebolla². Cavallito y Barley en 1944 aislaron los principales compuestos antimicrobianos del ajo; identificaron el componente antimicrobiano como alicina. La alicina se forma por acción de la enzima aliinasa sobre la aliína. La reacción ocurre sólo cuando las células del ajo están desintegradas liberando la enzima para que actúe sobre el sustrato; una reacción similar ocurre en la cebolla²

El poro o puerro (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) pertenece a la familia de las Liliáceas en donde están incluidos el ajo y la cebolla, pero a diferencia de los extensos estudios a los han sido sometidos el ajo y algunas variedades de cebolla³ casi no existen referencias al poro, razón por la cual en el presente trabajo se presenta la evaluación antimicrobiana *in vitro* de un extracto oleoso del poro.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Los poros (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*) se obtuvieron en la central de abastos de la ciudad de Puebla. Los criterios de selección para la adquisición de los poros fueron: buen aspecto (sin magulladuras), buen color (blanco en el bulbo y verde glauco las hojas) y sin contaminación. La determinación de género y especie fue realizada por botánicos de la Facultad de Biología de la BUAP por comparación con sus bases de datos. Se empleó la parte comestible del poro (bulbo) al cual se le eliminó la primera capa de hojas; se lavó con agua destilada estéril, cortó en rodajas de entre 0,5 y 1 cm. A una muestra se le determinó humedad en una termobalanza; al resto se le sometió a desecación química (sílica gel), hasta reducir la humedad al 60% para evitar pérdida de compuestos volátiles. El poro desecado se guardó en frascos secos que se almacenaron a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro hasta su empleo.

Las cepas bacterianas utilizadas se adquirieron del cepario de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, a las cuales se les realizaron antibiogramas (BIO – RADSA), tinción de Gram y pruebas bioquímicas^{4,5} para asegurar la identidad de las mismas. Las cepas empleadas fueron: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

El cloranfenicol empleado para los controles positivos fue un estándar secundario proporcionado por el área de farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas.

Preparación de los extractos

El extracto etanólico (tintura) se obtuvo por maceración del poro desecado en etanol 96% en una relación 1:1 p/v; la maceración se realizó a temperatura ambiente durante cinco semanas en un frasco ámbar; al término se filtró la muestra con papel filtro Whatman número 1.

El extracto oleoso se realizó empleando 250 ml de éter etílico y 10 g del poro desecado, en el equipo Soxhlet⁶ hasta completar 12 reflujos, el extracto se evaporó en un rotavapor a sequedad; se pesó un gramo y se le agregó agua hasta obtener un peso final de 10 g, se sonicó por 2 tiempos de 30 minutos a 60 Hertz a fin de obtener una dispersión homogénea.

Actividad antimicrobiana

Las cepas fueron sincronizadas⁷ por pases sucesivos en caldo nutritivo y estandarizadas empleando como referencia el tubo número 1 del nefelómetro de McFarland.⁵

Difusión en agar

Se realizó siguiendo el método de Kirby- Bauer⁸ en agar Müller–Hinton, empleando penicilindros en lugar de discos de papel; usando un asa de hockey se esparcieron 0,5 ml del cultivo estandarizado en la superficie del agar, en cada penicilindro se colocó 100 µl del extracto respectivo (10%); en la misma placa se corrió un blanco y un control positivo con el antibiótico al que fue sensible la cepa (cloranfenicol).

Cinética de crecimiento

Para realizar la prueba de cinéticas de crecimiento microbiano⁸ se utilizó un baño con agitación (50 rpm), a temperatura constante de 37 °C y matraces nefelométricos estériles; se utilizó un control positivo (bacterias + antibiótico + caldo nutritivo), un testigo (bacterias + caldo nutritivo) y para probar el extracto (bacterias + extracto + caldo nutritivo); el volumen final de cada matraz fue de 50 ml, se probó diferentes concentraciones del extracto y todas se realizaron por triplicado. Se midió la absorbancia cada hora durante un periodo de 9 horas continuas, con la ayuda de un espectrofotómetro a 520 nm (Leitz, Modelo M. serie N° 33812). Los porcentajes de inhibición se obtuvieron comparando el promedio de las absorbancias de la última hora del testigo y el promedio de las absorbancias de la última hora de los matraces con extracto

Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la ayuda del software MINITAB 14 (LEAD Technologies Inc.); se trabajó a un nivel de confianza del 95 % en el cual se analizó las medias de las pendientes de la parte logarítmica de cada una de las curvas de crecimiento y se determinó las diferencias significativas con la prueba de Tuckey.

RESULTADOS

La prueba por difusión en agar demostró que en la fase alcohólica no se encontraban principios activos antimicrobianos, no así en el extracto oleoso que demostró actividad contra las cepas probadas. En el caso de *Bacillus cereus* no se realizó el ensayo de difusión en agar; en la tabla 1 destaca el halo de inhibición con un valor de 8,4 cm contra *E. coli*.

Tabla 1: Diámetro de los halos de inhibición (cm) difusión en agar

Bacteria	Extracto alcohólico	Extracto oleoso
<i>E. coli</i>	0	8,4
<i>Sta. aureus</i>	0	7,4
<i>Bacillus cereus</i>	nd	nd

nd = No determinado

En el caso de las cinéticas de crecimiento se probaron concentraciones de 0,4%, 0,2% y 0,1% (v/v) de las cuales la mejor concentración varió con el microorganismo de prueba; para *E. coli* la más efectiva fue de 0,2% con un porcentaje de inhibición de 91,89%; el análisis estadístico demostró diferencia significativa entre el matraz testigo y los adicionados con el extracto, no así entre las diferentes concentraciones del extracto. En el caso de *Staphylococcus aureus* y

Bacillus cereus la mejor concentración fue de 0,4% con un 72,65% y 65,13% de inhibición, respectivamente. (figuras 1, 2 y 3).

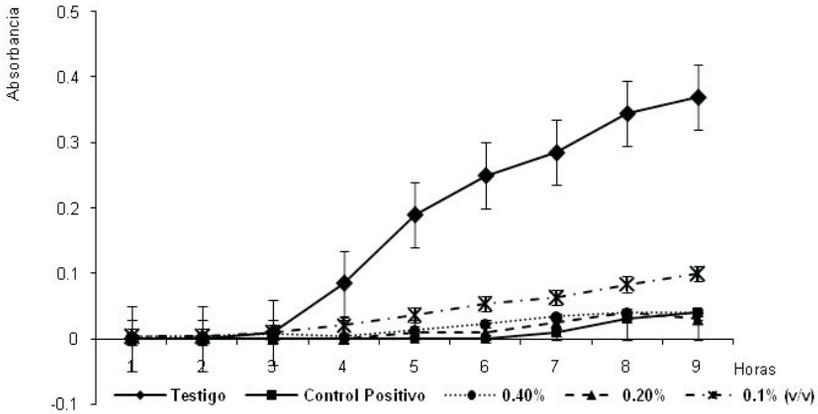


Figura 1: Curva de crecimiento de *Escherichia coli*, en presencia del extracto oleoso del poro. Se muestra el promedio de tres repeticiones y las desviaciones estándar

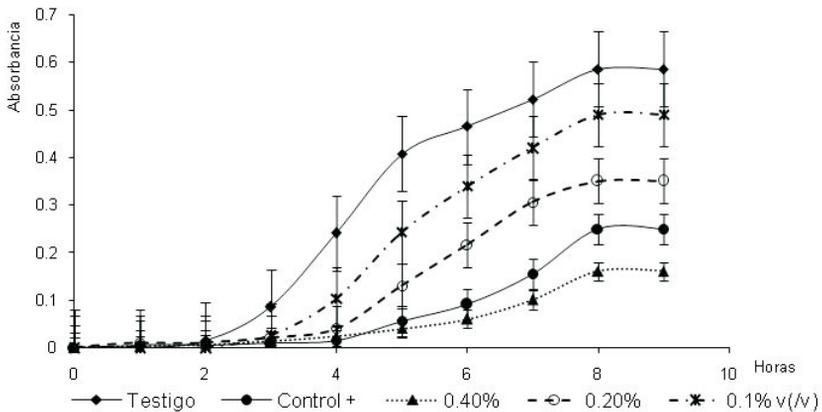


Figura 2: Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia del extracto oleoso del poro. Se muestra el promedio de tres repeticiones y las desviaciones estándar

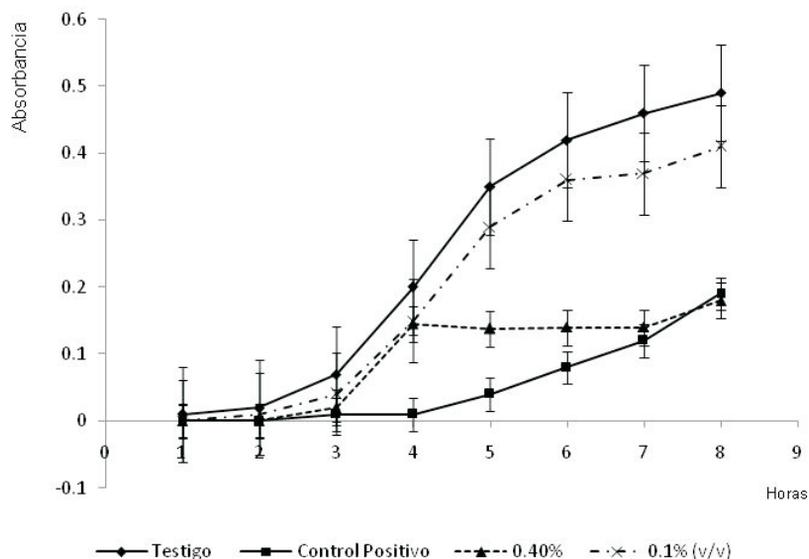


Figura 3: Curva de crecimiento de *Bacillus cereus* en presencia del extracto oleoso del poro. Se muestra el promedio de tres repeticiones y las desviaciones estándar

El análisis estadístico del crecimiento de *Staphylococcus aureus* demostró que la diferencia entre las pendientes es significativa entre las concentraciones 0,2% y 0,4% del extracto y respecto del control positivo; para *Bacillus cereus* existe una diferencia significativa entre la concentración de 0,4% y el control positivo y el testigo. (tablas 2 y 3)

Tabla 2: Análisis estadístico* de medias de las pendientes obtenidas en las cinéticas de crecimiento de los organismos de prueba

Parámetro/Microorganismo	<i>E. coli</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Testigo	0,061 ^a	0,100 ^a	0,087 ^a
CONTROL (+)	0,013 ^b	0,040 ^{b,c}	0,037 ^c
EXT. 1 (0,4%)	0,010 ^b	0,028 ^b	nd
EXT. 1 (0,2%)	0,007 ^b	0,059 ^c	0,022 ^b
EXT. 1 (0,1%)	0,015 ^b	0,088 ^a	0,077 ^a

nd = No determinado

* Letras diferentes indican diferencias significativas

Tabla 3: Porcentajes de inhibición obtenidos en presencia del extracto oleoso

Parámetro/Microorganismo	<i>E. coli</i>	<i>Sta. aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	Porcentaje de inhibición		
0,40%	89,19	72,65	65,13
0,20%	91,89	40,17	nd
0,10%	72,97	16,24	14,86

nd = No determinado

DISCUSIÓN

Los halos de inhibición obtenidos en el ensayo de difusión en agar superan en mucho los marcados por la casa comercial del sensidisco (BIO – RADSA) ya que esta marca 2,4 cm para una cepa sensible lo que nos indica la alta actividad antimicrobiana del extracto del poro; esta técnica es muy utilizada para determinar la efectividad de un antimicrobiano; Burt y Reinder⁹ prueban la actividad antibacteriana de cinco aceites esenciales mediante la prueba de difusión en agar contra *E. coli* y obtuvieron que el aceite de orégano es efectivo contra esta bacteria con 2,4 cm de diámetro en el halo de inhibición; Bayramoglu *et al*¹⁰ encuentran resultados similares al utilizar aceite de orégano contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* utilizando la misma técnica obteniendo halos de inhibición de 4 y 4,5 cm de diámetro, respectivamente; la diferencia entre los halos de inhibición obtenidos tanto por Burt como por Bayramoglu y en este trabajo, radica en las concentraciones utilizadas ya que en el primer trabajo se utilizó el aceite esencial al 1%, mientras que en el segundo al 2% y en este trabajo al 10%; Echemendía *et al*¹¹ demuestran la actividad *in vitro* del propoaramiel contra cepas aisladas de muestras clínicas, entre ellas *Escherichia coli* y *Sta. aureus*, mediante difusión en agar; utilizaron concentraciones similares a las aquí empleadas con resultados satisfactorios.

Las cinéticas de crecimiento presentadas por los microorganismos de prueba presentan, en general, un alargamiento en la fase de latencia y una disminución en la velocidad de reproducción, características de un comportamiento bacteriostático.

La inhibición demostrada contra *E. coli* es muy eficaz ya que comparada con trabajos previos como el de Marroquín *et al*¹², que probaron la actividad antimicrobiana del apio contra esta bacteria, obtuvieron 55% de inhibición, porcentaje que es superado por todas las concentraciones aquí empleadas. Respecto a las concentraciones empleadas, Gutiérrez *et al*¹³ hacen una investigación con aceites esenciales y la combinación de éstos para potenciar el efecto inhibitor sobre bacterias como *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomona aeuriginosa*, utilizando concentraciones que van desde 300 ppm hasta 50,000 ppm; las concentraciones empleadas en este trabajo están en este rango, incluso más bajas que las utilizadas por Gutiérrez *et al*; además, el poro por sí sólo presenta buenos porcentajes de inhibición.

El extracto provocó en *Staphylococcus aureus* que la fase de latencia se alargara por tres horas, aproximadamente, y la fase exponencial disminuyera; en las tres concentraciones empleadas sigue un comportamiento similar; por lo tanto se evidencia el efecto bacteriostático: a mayor concentración del extracto disminuye más la velocidad de crecimiento de la bacteria; sin embargo, aunque lento, sigue habiendo crecimiento. Lara *et al*¹⁴ prueban el extracto oleoso de tomatillo contra la misma bacteria obteniendo 23% de inhibición; comparado con el ejemplo anterior el extracto oleoso del poro es más efectivo.

En el caso de *Bacillus cereus* la concentración de 0,4% el extracto logró alargar la fase de latencia hasta las tres horas, disminuir la fase logarítmica y mantenerla casi constante durante casi 4 horas, demostrando una acción bacteriostática efectiva. Manzo *et al*¹⁵ prueban la efectividad del extracto oleoso de brócoli contra esta bacteria utilizando la misma técnica y obteniendo 8% de inhibición; porcentaje que es fácilmente superado por el extracto oleoso del poro; Demo *et al*¹⁶, probaron la actividad antimicrobiana de plantas aromáticas de Argentina contra diversas bacterias mediante la técnica de difusión en agar y encontraron que *Bacillus cereus* es susceptible a *Aloysia triphylla* con una concentración mínima inhibitoria de 0,5 mg/ml, por otro lado, Bonyadian y Moshtaghi¹⁷ obtienen una concentración mínima inhibitoria contra *Bacillus cereus* de 0,3% al probar el aceite esencial de menta por el método de dilución en caldo, provocando alargamiento en la fase de latencia y disminución en la fase logarítmica; lo mismo sucedió en el caso del extracto del poro a 0,4%; además, demuestra que la potencia con que se ejerce el efecto microbiano puede variar de acuerdo a las condiciones que se utilicen, la técnica, la planta, el tipo de extracto y que al utilizarse como un antimicrobiano *in vivo* podría haber otro tipo de factores que intervengan en su acción antimicrobiana.

CONCLUSIONES

Se demostró que el poro presenta principios activos antimicrobianos, que además son de naturaleza no polar, debido a que fue el extracto oleoso del poro, obtenido con un solvente orgánico de baja polaridad, el que demostró mejores resultados.

Las cinéticas de crecimiento bacteriano, corroboraron que las bacterias que se probaron, todas fueron sensibles a los extractos oleosos del poro, siendo la más sensible *E. coli* al inhibirla en un 91%; además, debido al comportamiento que siguieron las bacterias al estar en contacto con el extracto, se puede decir que la acción que ejerce el extracto es bacteriostática.

Estos resultados permiten proponer la necesidad de comprobar si el efecto es realmente bacteriostático o bactericida; además, de realizar estudios *in vivo* e *in situ* empleando sistemas modelo o directamente alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los departamentos de Microbiología y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP, los apoyos brindados para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Schultes, R. E. The kingdom of plants. En: Thomson, W.A.E. (Ed.) Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co., New York. 1978.
2. Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Ed. Acribia. España. 2001.
3. García, R. R.O., Herrera, A. F. C. Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*. *BISTUA* 2007; 5 (2): 68-79
4. Macfaddin, M.F. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3a ed. Ed. Médica Panamericana. 2003.
5. Finegold, S. M.; Baron, E. J. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 1989.
6. Kuklinski, C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. España. 2003

7. Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A. Manual de microbiología. Ed. El manual moderno S. A. México. 1975
8. Madigan M. T. Martinko J. M. Parker J. Biología de los microorganismos. Ed. Prentice Hall. USA. 2000.
9. Burt S.; Reinder R. Antibacterial activity of selected of plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*. 2003;36: 162-167
10. Bayramoglu E.; Gülümser G.; Karaboz I. The investigation of antibacterial activities of some essential oils in Wet Blue Leather. *International journal of natural and engineering sciences*. 2008; 2 (1): 32-36
- 11.- Echemendía A.; Martínez M.; Carballo L.; Álvarez F.; Gutiérrez M.; Lago A.; Hidalgo P. Actividad "In Vitro" del propoaromiel contra cepas aisladas de muestras clínicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* número especial 2005;36: sin número
- 12.- Marroquín G. I., Dávila M. R. M., Ávila S-S. R., Lazcano H. M. Identificación de sustancias con actividad antimicrobiana en apio (*Apium graveolens*). *RESPYN Edición Especial* 2006;2:6
13. Gutiérrez C., Barry R., Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions whit food ingredients. *International journal of food microbiology*. 2008; 124: 91-97
14. Lara S. A., Dávila M. R., Navarro C. A., Ávila S. R. Determinación de la actividad antimicrobiana del tomatillo (*Physalis ixocarpa*). *RESPYN Edición Especial* 2008; 2: 103
15. Manzo. M. J., Dávila M. R. M., Ávila S-S. R., Navarro C. A. R. Evaluación antimicrobiana del brócoli (*Brassica oleracea* Var. *Itálica*). XIV XVI Seminario latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de los alimentos. Presentación en cartel. Habana, Cuba. 2006.
16. Demo M.; Oliva M.; López M.; Zunino M.; Zygadlo J. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical biology*. 2005; 43(2): 129-134
17. Bonyadian M.; Moshtaghi H. Bactericidal activity of some plants essential oils against *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*. *Research journal microbiology*. 2008; 3 (11): 648-653.

ANÁLISIS PROXIMAL, ANTINUTRIENTES, PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y DE AMINOÁCIDOS DE SEMILLAS Y TORTAS DE 2 ESPECIES DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*)

Candy Ruiz^a, Camilo Díaz^b, José Anaya^c, Rosario Rojas^{a,b,*}

RESUMEN

Se determinó la composición proximal, perfil de aminoácidos, perfil de ácidos grasos y el contenido de antinutrientes (saponinas y taninos) de las semillas y tortas (residuos después de la extracción del aceite) de las especies *Plukenetia huayllabambana* y *Plukenetia volubilis*. Las semillas de *P. huayllabambana*, proveniente de la provincia Rodríguez de Mendoza, poseen mayor contenido de aceite (54,3 versus 49,0%), mientras que las procedentes de la provincia de San Martín (*P. volubilis*) mostraron mayor contenido de proteínas (29,6 versus 24,5 %). Asimismo, el contenido proteico de la torta de *P. volubilis* es mayor que el de *P. huayllabambana* (59 y 46%, respectivamente). El contenido de aminoácidos esenciales de las semillas de ambas especies de *Plukenetia* es el adecuado de acuerdo a lo recomendado por la FAO/OMS, a excepción de los aminoácidos lisina y leucina. Tanto en semillas como en tortas, la concentración de ácido linoleico (omega-6) es mayor en *P. volubilis*, mientras que el linolénico (omega-3) se encuentra en mayor proporción en *P. huayllabambana*.

Palabras clave: Ácidos grasos, aminoácidos, *Plukenetia volubilis*, *Plukenetia huayllabambana*, sacha inchi

PROXIMATE ANALYSIS, ANTINUTRIENTS, FATTY ACIDS AND AMINO ACIDS PROFILES OF SEEDS AND CAKES FROM 2 SPECIES OF SACHA INCHI: *Plukenetia volubilis* and *Plukenetia huayllabambana*

ABSTRACT

We determined the proximate composition, amino acid profile, fatty acid profile and antinutrients contents (saponins and tannins) of seed and cakes (residues after oil extraction) of *Plukenetia huayllabambana* and *Plukenetia volubilis*. The seeds of *P. huayllabambana*, from the province of Mendoza Rodríguez, has higher oil content (54.3 versus 49.0%), while those from the province of San Martín (*P. volubilis*) showed higher protein content (29.6 versus 24.5%). Furthermore, protein content of *P. volubilis*' cake is greater than the one of *P. huayllabambana* (59 and 46%, respectively). The essential amino acid content of the seeds of both *Plukenetia* species is adequate, as recommended by the FAO/WHO, except for the amino acids lysine and leucine. In cakes, as well as seeds, the concentration of linoleic acid (omega-6)

^a Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú, rosario.rojas@upch.pe

^b Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

^c ALINAPSAC.

was larger in *P. volubilis*, while linolenic acid (omega-3) was found in greater proportion in *P. huayllabambana*.

Key words: Aminoacids, fatty acids, Inka peanut, *Plukenetia huayllabambana*, *Plukenetia volubilis*.

INTRODUCCIÓN

El género *Plukenetia* L. (Euphorbiaceae) está constituido por 19 especies, de las cuales 12 se encuentran en el neotrópico y las restantes en el viejo mundo. En el Perú se ha reconocido las especies *Plukenetia volubilis*, *P. brachybotrya*, *P. polyandenia*, *P. lorentensis* y, más recientemente, se ha descrito la nueva especie *P. huayllabambana*.¹⁻³

La especie más cultivada en el Perú es *P. volubilis*, la cual crece entre los 30 a 2110 msnm en los departamentos de Amazonas, Cusco, Junín, Loreto, Pasco, San Martín y Madre de Dios. Esta especie es muy reconocida por sus semillas con alto contenido de proteínas, tocoferoles y aceite rico en ácidos grasos omega-3 y omega-6.⁴⁻¹⁰ Luego de la extracción del aceite por medio de solventes o prensado queda un residuo (“torta”) que es rico en proteínas de alto valor nutricional.¹¹

Otra especie que se está cultivando principalmente en la provincia de Rodríguez de Mendoza (Amazonas) es *P. huayllabambana*, la cual crece a más altura (1 300 a 2 200 msnm) y posee semillas de mayor tamaño que *P. volubilis*. Un estudio técnico menciona que *P. huayllabambana* poseería mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados que *P. volubilis*.¹²

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer el potencial nutricional de las semillas y residuos de extracción del aceite (“tortas”) de las especies *Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana* determinando la composición proximal, perfil de ácidos grasos, perfil de aminoácidos y antinutrientes (saponinas y taninos) de dichas muestras.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos. Espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis 1240. Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), Elite LaChrom: bomba L-2130, detector DAD L-2455, Software EZChrom Elite Client/Server versión 3.2. La columna analítica utilizada fue Superspher® STAR RP-18e (250 mm x 4,6 mm, 4 µm de tamaño de partícula). Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975C*. Se empleó una columna capilar polar HP-FFAP (30 m x 250 µm x 0,25 µm).

Reactivos. Ácido tánico, reactivo de Folin-Ciocalteu, kit de L- aminoácidos y cloruro de dabsilo, fueron adquiridos de Laboratorios SIGMA-Aldrich.

Muestras. Las muestras botánicas y semillas de *P. huayllabambana* y *P. volubilis* fueron colectadas e identificadas por el biólogo Camilo Díaz en marzo del 2011. Las muestras de herbario de cada especie fueron depositadas en el Herbario de la Sección de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los respectivos residuos (“tortas”) obtenidos de cada una de las especies luego de la extracción del aceite por medio de prensado fueron suministrados por la empresa ALINAP SAC (Sr. José Anaya). Las 4 muestras obtenidas fueron codificadas de la siguiente manera:

AI-RM-05: semillas de *P. huayllabambana* colectadas en la provincia de Rodríguez de Mendoza, departamento de Amazonas.

TRM: torta de semillas de *Plukenetia huayllabambana* (AI-RM-05).

AI-SM-062: semillas de *P. volubilis* colectadas en la provincia de San Martín, departamento de San Martín.

TSM: torta de semillas de *P. volubilis* (AI-SM-062).

Análisis proximal

El análisis proximal de cada una de las muestras fue realizado según los métodos recomendados por la AOAC¹³: Humedad, por secado de las muestras a 105 °C durante 3 h en una estufa; proteínas (N x 6,25) por método de Kjeldahl; grasas por método de Soxhlet; cenizas por incineración en mufla; fibra por tratamiento con ácido y base; carbohidratos por diferencia (100 – porcentaje de cada uno de los anteriores).

Determinación de taninos

Se siguió la metodología descrita por Lastra *et al*¹⁴, según la cual las muestras son previamente extraídas con una mezcla de acetona – agua (7:3) durante 4 horas en un equipo Soxhlet. Luego de filtrar y evaporar el solvente en un rotaevaporador, se cuantificó el contenido de taninos en el residuo por medio de una curva de calibración, teniendo como estándar al ácido tánico a concentraciones de 0,025 – 0,15 mg/ml. Se midió la absorbancia de las soluciones en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 700 nm.

Determinación del contenido de saponinas

Cada una de las muestras fue sometida a una extracción con metanol por 4 horas en un equipo Soxhlet. Luego de filtrar y evaporar el solvente en un rotaevaporador, el residuo fue distribuido en una mezcla de agua y diclorometano (1:1). La fase acuosa fue extraída con 1-butanol, separando luego la fase orgánica para concentrarla a sequedad en un rotaevaporador. El residuo se disolvió con agua destilada en una fiola de 100 ml y 1 ml de esta solución fue mezclado con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y 1 ml de cloruro de cobalto al 0,2%. Se dejó reposar la mezcla por 10 minutos y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 284 nm¹⁵. Para la cuantificación de saponinas en la muestra problema se preparó una curva de calibración con soluciones de saponina a concentraciones de 0,025 a 0,15 mg/ml.

Determinación del perfil de aminoácidos

Se pesó aproximadamente entre 1 a 6 mg de los 20 L–aminoácidos (Sigma-Aldrich) en una fiola de 10 ml y se enrasó con agua destilada. Se tomó 0,5 ml de la solución y se agregó 0,5 ml de HCl 12N, 30 µl de 2-mercaptoetanol y se burbujeó la mezcla con gas nitrógeno, calentando a 110 °C por 24 horas.

De igual manera, se tomó 0,5 ml de la mezcla de aminoácidos y añadió 0,5 ml de NaOH 8 N y se burbujeó la mezcla con gas nitrógeno y se calentó a 110 °C por 24 horas.

Ambas soluciones hidrolizadas se neutralizan y concentran; después se traspasa a una fiola de 10 ml y se enrasa con solución de bicarbonato de sodio 50 mM.

Para preparar la curva de calibración de aminoácidos se tomó alícuotas de 20, 40, 80 y 160 µl de la solución stock de mezcla de aminoácidos y se llevó cada solución a un volumen final de 160 µl con solución de bicarbonato de sodio 50 mM. Se adicionó luego a cada tubo 260 µl de la solución de cloruro de dabsilo 12,4 mM. Se calentó las mezclas a 70 °C por 10 minutos, luego de los cuales se agregó 580 µl de solución buffer de fosfato: etanol (1:1). Se inyectó 10 µl de las mezclas derivatizadas en el HPLC.

Se pesó aproximadamente 1-3 mg de muestra y se hidrolizó y derivatizó de manera similar al procedimiento para la mezcla de estándares de aminoácidos. Se inyectó 10 µl de la muestra derivatizada en el HPLC.¹⁶

Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos fueron extraídos usando pentano como solvente y esterificados con KOH al 0,1% en metanol. Luego de filtrar, se inyectó 1 µl de la muestra en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.¹⁷ Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: split ratio 20:1; temperatura de inyección 250 °C; temperatura del horno se mantuvo a 150 °C por 1 minuto, para luego iniciar un gradiente de temperatura (2,5 °C/min) hasta alcanzar 230 °C, manteniendo esta temperatura final por 1 minuto. El gas de arrastre usado fue helio a un flujo de 0,63 ml/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis proximal muestran que las semillas de *Plukenetia huayllabambana* se destacan por su mayor contenido de grasas en comparación con las de *P. volubilis* (54 y 49%, respectivamente). Ambas especies presentan, inclusive, mayor contenido de aceite que otras semillas oleaginosas, como por ejemplo las de soya (19%), maní (45%), algodón (16%) o girasol (48%).⁴

Además del aceite, las semillas contienen un alto porcentaje de proteínas; pero en este caso más bien se observa que el contenido proteico es mayor para *P. volubilis* (29,6%) que para *P. huayllabambana* (24,5%).

Algo similar ocurre para las tortas, donde el mayor contenido de aceite sigue siendo para la especie *P. huayllabambana* y el mayor contenido de proteínas para *P. volubilis* (tabla 1), lo cual implicaría que para la extracción de proteínas o elaboración de hidrolizados proteicos a partir de semillas o tortas, la especie más promisoría sería *P. volubilis*.

Tabla 1. Composición proximal (base seca) de semillas y tortas de dos especies de *Plukenetia*

Componente	<i>Plukenetia huayllabambana</i>		<i>Plukenetia volubilis</i>	
	Semillas (AI-RM-05)	Torta (TRM)	Semillas (AI-SM-06)	Torta (TSM)
Grasa	54,3 ± 1,0	9,7 ± 0,5	49,0 ± 1,0	7,8 ± 0,2
Proteínas	24,5 ± 1,2	46,1 ± 1,1	29,6 ± 0,5	59,0 ± 0,7
Cenizas	3,8 ± 0,4	6,0 ± 0,1	2,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2
Fibra	7,4 ± 0,5	3,3 ± 0,4	6,6 ± 0,7	4,5 ± 0,6
Carbohidratos	10,0 ± 0,7	34,9 ± 0,1	12,1 ± 1,3	23,9 ± 1,7

El porcentaje de proteína (29,6%) y grasas (49,0%) hallado por nosotros para *P. volubilis* es mayor al reportado por Gutiérrez (24,7% y 42%, respectivamente), para una muestra procedente de Colombia. Por otro lado, Pascual reporta un mayor contenido de grasas (54,9%), pero menor porcentaje de proteínas (25,9%).⁵ Las diferencias observadas en la composición proximal de *P. volubilis* pueden deberse a diversas variables, como por ejemplo,

el lugar de procedencia, tipo de almacenamiento de las semillas y su tratamiento post-cosecha. El análisis proximal de los residuos de extracción del aceite (torta) realizado por Pascual⁵ muestra resultados muy similares a los nuestros (tabla 1); sin embargo, Mondragón¹¹ reporta para la torta de *P. volubilis* un contenido residual de aceite mucho mayor (37,3%), lo cual implicaría que el método de extracción utilizado no fue el óptimo.

No se ha encontrado reportes previos en la literatura científica sobre la composición proximal de semillas y torta de *P. huayllabambana*.

En la tabla 2 se observa que, para ambas especies, el perfil de ácidos grasos de las semillas es prácticamente igual al de las tortas, denotando que el proceso de extracción utilizado no degradó dichos componentes. No se encontró diferencias en la concentración de ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados en las 4 muestras analizadas; pero cabe destacar que el contenido de ácido linoleico (omega-6) es mayor en *P. volubilis*, mientras que el linolénico (omega-3) se encuentra en mayor proporción en *P. huayllabambana*.

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de semillas y tortas de dos especies de *Plukenetia*

Ácido graso	Composición relativa (%)			
	<i>Plukenetia huayllabambana</i>		<i>Plukenetia volubilis</i>	
	Semillas (AI-RM-05)	Torta (TRM)	Semillas (AI-SM-06)	Torta (TSM)
Palmitico (16:0)	5,3	6,1	3,8	4,5
Estearico (18:0)	1,9	1,2	2,3	1,9
Oleico (18:1)	9,6	9,7	8,7	10,5
Linoleico (18:2)	29,3	28,4	34,6	36,0
Linolénico (18:3)	53,9	54,6	50,6	47,1
<hr/>				
Saturados	7,2	7,3	6,1	6,4
Monoinsaturados	9,6	9,7	8,7	10,5
Poliinsaturados	83,2	83,0	85,2	83,1

El perfil de ácidos grasos reportado para semillas de *P. volubilis* procedente de Colombia⁶ es similar a lo encontrado por nosotros; sin embargo, Pascual y Mejía⁵ y Hamaker *et al*⁴ y encontraron menor porcentaje de ácido linolénico (43,8-45,2%).

En la tabla 3 se muestra el perfil de aminoácidos de semillas y tortas de ambas especies de *Plukenetia*. Se puede observar, que a excepción de lisina y leucina, ambas semillas estarían cumpliendo con los requerimientos de aminoácidos en la dieta recomendados por la FAO para todos los grupos etáreos, excepto los infantes.

En el caso de las tortas nosotros encontramos una deficiencia en los aminoácidos lisina, leucina, metionina+cisteína y fenilalanina+tirosina. Estas mismas deficiencias fueron reportadas en el trabajo de Mondragón, aunque en mayor proporción.

Tabla 3. Perfil de aminoácidos de semillas y tortas de 2 especies de *Plukenetia*

Aminoácido	Contenido en mg/g de proteína				FAO/OMS
	<i>P. huayllabambana</i>		<i>P. volubilis</i>		
	Semillas (AI-RM-05)	Torta (TRM)	Semillas (AI-SM-06)	Torta (TSM)	
ácido aspártico	19	16	14	11	...
ácido glutámico	41	12	30	21	...
asparagina	124	33	80	46	...
serina	28	15	18	61	...
treonina	40	48	36	64	34
glicina	225	215	218	201	...
alanina	20	13	14	22	...
arginina	39	14	44	17	...
prolina	24	49	23	59	...
valina	52	36	40	47	35
metionina	13	12	14	17	...
isoleucina	30	36	26	30	28
leucina	52	28	37	39	66
fenilalanina	21	19	13	20	...
cisteina	17	10	8	11	...
lisina	31	6	28	12	58
histidina	19	21	17	32	19
tirosina	82	22	58	24	...
glutamina	46	89	31	65	...
triptofano	12	14	13	11	11

Si bien, las semillas y tortas de ambas especies de *Plukenetia* son promisorias para la alimentación humana, es necesario confirmar que el contenido de anti-nutrientes no sea elevado. Los anti-nutrientes como los taninos pueden unirse o precipitar las proteínas digestivas disminuyendo su capacidad de digerir los alimentos. En el caso de las saponinas, se ha visto que algunas de ellas pueden ser hemolíticas.

En la tabla 4 se observa que las semillas de *P. volubilis* presentan mayor concentración de taninos que las de *P. huayllabambana*; aunque a valores menores a lo reportado en semillas de soya (34,9 mg/100 g muestra).¹⁸

El mayor contenido de saponinas lo poseen las semillas de *P. huayllabambana* (tabla 4); pero no supera el valor encontrado para la soya (34,6 mg/100 g muestra).¹⁸

Tabla 4. Contenido de saponinas y taninos en semillas y tortas de dos especies de *Plukenetia*

Antinutriente	<i>Plukenetia huayllabambana</i>		<i>Plukenetia volubilis</i>	
	Semillas (AI-RM-05)	Torta (TRM)	Semillas (AI-SM-06)	Torta (TSM)
mg saponinas/100 g muestra seca	12,40 ± 1,05	1809,60 ± 234,50	4,80 ± 2,60	1062,10 ± 222,40
mg taninos (expresados como ácido tánico)/ 100 g de muestra seca	0,37 ± 0,02	5,59 ± 0,36	1,37 ± 0,05	6,35 ± 0,26

CONCLUSIONES

Las semillas de *Plukenetia huayllabambana* se destacan por su mayor contenido de grasas en comparación con las de *Plukenetia volubilis* (54 y 49%, respectivamente); por el contrario, el contenido proteico de esta última es mayor (29 versus 25%). Asimismo, el contenido proteico de las tortas es más alto en *P. volubilis* (59%) en comparación con *P. huayllabambana* (46%). Sin embargo, ambas especies son deficientes en los aminoácidos esenciales lisina y leucina. La concentración de ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados es similar en las tortas y semillas de ambas especies; pero cabe destacar que el contenido de ácido linoleico (omega-6) es mayor en *P. volubilis*, mientras que el linolénico (omega-3) se encuentra en mayor proporción en *P. huayllabambana*.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo gracias al auspicio del FIDECOM-Innovate Perú (Proyecto 160-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010: Aprovechamiento de la torta de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* y *Plukenetia huayllabambana*) en la obtención de hidrolizados proteicos, mediante un proceso enzimático estandarizado, para su uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética).

REFERENCIAS

- Rodríguez, A., Corazon-Guivin, M., Cachique, D., Mejía, K., Del Castillo, D., Renno, J-F., García-Dávila, C. *Revista Peruana de Biología*, **2010**; 17, 325.
- Dostert, N., Roque, J., Brokamp, G., Cano, A., La Torre, M.I., Weigend, M. Factsheet: Datos botánicos de Sacha Inchi. *Plukenetia volubilis* L. Proyecto Perú Biodiverso. GTZ-SECO-MINCETUR. **2009**.

3. Bussmann, R., Tellez, C., Glenn, A. *Nordic Journal of Botany*, **2009**; 27, 313.
4. Hamaker, B.R., Valles, C., Gilman, R., Hardmeier, R.M., Clark, D., García, H.H., et al. *Cereal Chemistry*, **1992**; 69, 461.
5. Pascual, G., Mejía, M. Extracción y Caracterización de aceite de sachá inchi. *Anales Científicos*, **2000**; XLII, 146.
6. Gutiérrez, L-F., Rosada, L-M., Jiménez, A. *Grasas y aceites.*, **2011**; 62, 76.
7. Maurer, N.E., Hatta-Sakoda, B., Pascual-Chagman, G., Rodriguez-Saona, L.E. *Food Chemistry*, **2012**; 134, 1173.
8. Follegatti-Romero, L.A., Piantino, C.R., Grimaldi, R., Cabral, F.A. *Journal of Supercritical Fluids*, **2009**; 49, 323.
9. Castaño, D.L., Valencia M.P., Murillo, E., Mendez, J.J., Joli, J.E. *Revista Chilena de Nutrición*, **2012**; 39, 45.
10. Fanali, C., Dugo, L., Cacciola, F., Beccaria, M., Grasso, S., Dacha, M., et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**; 59, 13043.
11. Mondragón, I. Estudio farmacognóstico y bromatológico de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (Sachá inchi), Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú, 2009.
12. Estudio Técnico sobre los Ácidos Grasos de Sachá Inchi – Amazonas, <http://es.scribd.com/doc/80846345/Estudio-Tecnico-sobre-los-Acidos-Grasos-de-Sacha-Inchi-Amazonas> (último acceso 29 de octubre 2012).
13. AOAC Official Methods of Analysis, 18th Edition (2005), métodos 925.40, 981.10, 942.05, 978.10.
14. Lastra, H., Rodríguez, E., Ponce, H., Gonzáles, M. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **2000**; 51, 17.
15. Vigo, C., Narita, E., Marqueza, L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2003**; 14, 46.
16. Ribeiro, P.B., Andrade, B.M., Silva, P., Baptista, R.M., Seabra, R.M., Valentão, P. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**; 56, 10973.
17. Frank, D., Pat, S., Allen, V. Agilent Column Selection for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters, *Agilent Technologies*, 2005.
18. Odumodu, C.U. *Continental Journal of Food Science and Technology*, **2010**; 4, 38.

EFFECTO *IN VITRO* DEL CROMO (VI) SOBRE UN BIOMARCADOR TUMORAL p53 Y DAÑO AL ADN EN HEPATOCITOS MURINOS

Pavel Delgado Sarmiento^{1*}, Corina Vera Gonzales², Carlos Arenas Chávez³

RESUMEN

El cromo es un metal pesado de uso múltiple en las diferentes especialidades que abarca la ciencia y tecnología en el mundo. Sin embargo, el cromo (VI) provoca daños en el ser humano por ingestión en dosis concentradas; produciendo anomalías en diferentes tipos de células; lo cual ha sido reportado por el Organismo Panamericano de Salud y Organismo Mundial de la Salud.

En el presente trabajo se plantea el estudio de los efectos del cromo (VI) *in vitro* en hepatocitos murinos, los cuales fueron cultivados en diferentes concentraciones (10, 20, 50 y 100 μM) de cromo (VI) y se evaluó el efecto sobre la viabilidad celular, DNA y la formación o expresión de la proteína p53. Los resultados de la investigación confirman que los hepatocitos tratados con el cromo (VI), inducen una disminución de la viabilidad celular en una relación: tiempo y dosis dependiente y en cuanto al estudio de la proteína p53 se observó que a partir de la concentración de 20 μM de cromo (VI), se inició la expresión de la proteína p53 incrementándose ésta a mayores concentraciones.

Se concluye, que el efecto citotóxico del cromo (VI) sobre los hepatocitos, implica el incremento de la expresión de la proteína p53 e inducción de muerte celular por apoptosis. Por otro lado, los resultados muestran que el cromo (VI) promueve la fragmentación del DNA, siendo ésta, dependiente de la concentración.

Palabras clave: Cromo, hepatocitos, viabilidad celular, proteína p53, DNA.

IN VITRO EFFECT IN MURINE HEPATOCYTES OF CHROMIUM (VI) ON A p53 TUMOR BIOMARKER AND DNA DAMAGE

ABSTRACT

Chromium is a heavy metal of multiple use in different areas of science and technology in the world. Nevertheless by information of organizations like the Health Ministry, it has been reported that chromium causes damage in the human being by ingestion in concentrated doses; producing anomalies in different types of cells, which has been reported by the Pan American Health Organization and World Health Organization.

This paper focuses on the study of the effects of chromium (VI) in murine hepatocytes, which were cultured *in vitro* in different concentrations (10, 20, 50 and 100 μM) of chromium (VI) and assessed its effects on cell viability, DNA and expression of p53 protein.

^{1*} Escuela de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Agustín, Av. Venezuela s/n Arequipa. pavelds1@yahoo.com

² Escuela de Química, Universidad Nacional de San Agustín, Av. Venezuela s/n Arequipa

³ Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica Santa María, Urb. San José s/n Umacollo Arequipa.

The results of *in vitro* research confirm that hepatocytes treated with the chromium (VI), induces a decrease in cell viability in its form and dose-dependent and time for the study of p53 protein was observed that as the concentration of 20 μM of chromium (VI) started p53 protein expression at higher concentrations this increase.

The conclusion is that the cytotoxic effect of chromium (VI) on hepatocytes, involves increased expression of p53 and induction of apoptotic cell death. Furthermore, the results show that chromium (VI) promotes DNA fragmentation, this being dependent on the concentration.

Key words: Chrome, hepatocytes, cell viability, p53 protein, DNA

INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante a tener en cuenta cuando se aborda el estudio de la toxicología del cromo, son las especies químicas que presenta y la doble relación que a través de ellas ejerce sobre la salud del individuo. El cromo (III), se comporta como un elemento esencial para la vida, al intervenir en procesos bioquímicos y fisiológicos indispensables. Pero el cromo (VI), se comporta como un elemento altamente tóxico para la salud del individuo^{1,2}.

El cromo (VI) y sus compuestos, son sustancias que se han venido estudiando desde hace aproximadamente 30 años en varios países, en relación con sus efectos adversos en la salud del individuo al entrar en contacto con ellos, especialmente en el medio ocupacional y también por exposiciones de carácter ambiental³.

La proteína p53 se la conoce como el guardián del genoma, debido a que es fundamental para mantener su integridad, impidiendo la acumulación de mutaciones originadas ya sea por mecanismos propios en la célula como por la acción de agentes externos a ella y puede activarse y desactivarse en distintos tejidos y fases de la enfermedad. La proteína se activa como respuesta a determinadas señales, como las fragmentaciones del ADN. Esta activación implica una ralentización del ciclo celular para permitir a la célula reparar este daño. En el caso de que el daño no sea reparado a tiempo, la activación de p53 conduce a una muerte celular programada (apoptosis). Esto hace que el gen que la codifica, llamado Tp53 en los humanos, sea considerado un gen supresor de tumores, ya que su inactivación puede facilitar la progresión de muchos tipos de células tumorales.⁴⁻⁸

Con el fin de estudiar con mayor amplitud los efectos de las diferentes concentraciones del cromo (VI) en células hepáticas de murinos, se planteó el siguiente trabajo de investigación a nivel celular y molecular, para conocer el efecto sobre la viabilidad celular, el DNA y la activación de la proteína p53. Los resultados de la investigación permitirán ser proyectadas a células humanas, y desarrollar medios de prevención.

PARTE EXPERIMENTAL

Aislamiento de hepatocitos

Los hepatocitos fueron extraídos del hígado de ratas blancas (*Rattus norvegicus*) de la variedad Wistar, de tres meses de edad, a las que se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*. El aislamiento de los hepatocitos se realizó según Yu-I *et al.*⁹ Se aisló 5×10^6 células, las cuales fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)-1640 y sembradas en diferentes pocillos para los tratamientos respectivos.

Tratamiento de hepatocitos para el estudio del efecto de la concentración y tiempo

Para esta evaluación fueron sembrados 1×10^6 hepatocitos por cada pocillo en medio RPMI-

1640 y tratados con diferentes concentraciones (5, 10, 20 y 50 μM) de cromo (VI) y NaCl 0,9% (control) durante 24 horas. Por otro lado se evaluó diferentes tiempos de incubación (1, 3, 6, 12 y 24 horas) con una concentración de cromo VI (10 μM) y NaCl 0,9% (control).

Determinación de la viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se hizo recuentos en una cámara de Neubauer utilizando la técnica de exclusión con Azul de Tripán (0,04%)¹⁰. En un tubo eppendorf se agregó 85 μl de NaCl al 0,9%, 5 μl de Azul de Tripán y 10 μl de la suspensión de hepatocitos de los diferentes tratamientos. Se consideró las células coloreadas de azul como células muertas y las no coloreadas como células vivas; se realizó tres repeticiones por cada ensayo.

Extracción del ADN

Las células fueron lisadas en 0,4 mL de buffer de lisis e incubadas a 37C durante 12 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se agregó a cada una de las muestras un volumen igual de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló bien por inversión durante 10 segundos. Se centrifugó las muestras por 5 minutos a 13,500 rpm.

Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y se precipitó el ADN adicionando 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Luego se recuperó el ADN por centrifugación a 13,500 rpm durante 1 minuto. Se enjuagó el pellet con etanol a 70%, luego se decantó el etanol y se secó el pellet a medio ambiente. Se resuspendió el ADN en buffer Tris/EDTA(TE) (1mL/mg de tejido); para facilitar la solubilidad se incubó con agitación a 65 C. Luego se guardó el ADN a -20 C.

Cuantificación y determinación de la pureza del ADN

Se preparó una dilución 1:200 del ADN en buffer TE obtenido y se realizó lecturas por espectrofotometría a 260 y 280 nm. El cociente de la absorbancia a 260 y 280 nm debe ser mayor a 1,8; si el cociente es menor a esta cantidad nos estaría indicando que el ADN está contaminado con proteínas. Se determinó la concentración de ADN teniendo en cuenta que: $\text{Abs}_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ de ADN de doble cadena.

Electroforesis del ADN

Se preparó el gel de agarosa al 1,8%. Una vez preparado el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con el buffer Tris/Borate/EDTA (TBE) 0,5X. Las muestras de ADN se mezclaron con el loading buffer 6X y se cargó 10 μg de ADN por cada pozo del gel. Se cargó también 5 μL del marcador de peso molecular. La corrida electroforética se realizó a 130 V durante 50 min; terminada la electroforesis, se visualizaron las bandas de ADN iluminando el gel con una lámpara de luz ultravioleta y se tomó fotos al gel para su análisis.

Identificación de p53

Electroforesis de proteínas

Se preparó un gel poliacrilamida al 10%¹¹. Se colocó 10 μg de proteínas totales¹² obtenidas (para cada una de las muestras) en los pozos del gel. La corrida electroforética se realizó a 150 V durante 1 hora.

Western Blot

Se preparó el sistema utilizando el cassette de transferencia. Se ensambló los componentes en el siguiente orden: sobre la rejilla roja del cassette se colocó la esponja / papel filtro / membrana / gel / papel filtro / esponja / rejilla negra.

Se transfirió las proteínas a 350 mA durante 3 horas. Todo el proceso de transferencia se realizó entre 15-20 °C.

Inmunodetección

Una vez terminada la transferencia se colocó la membrana en la solución de bloqueo (albúmina 3% o leche en polvo descremada 5% en Buffer Fosfato Salino –Tween (PBS-T)) y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche en refrigeración.

Luego se adicionó el primer anticuerpo (anti-p53 de ratón) diluido 1:1000 y se incubó la membrana con el anticuerpo durante toda la noche en refrigeración. Seguidamente se lavó la membrana con Buffer fosfato salino y se adicionó el segundo anticuerpo (anti-mouse IgG-HRP) diluido 1:5000 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Finalmente, las membranas fueron reveladas por el método Quimio-luminiscencia Intensificada. (ECL).

Cuantificación de óxido nítrico (NO)

Se evaluó la concentración de nitritos en cada uno de los sistemas como un indicador de la producción de óxido nítrico por los hepatocitos. Se midió 500 μ L de sobrenadante y se mezcló con 500 μ L del reactivo de Griess; dejándolo en reposo durante cinco minutos, luego las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 540 nm; se utilizó el NaNO_2 como estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de cromo (VI) sobre la viabilidad celular de hepatocitos murinos

Se cultivó hepatocitos en medio RPMI-1640 en presencia de NaCl 0,9% (control) con concentraciones variables de cromo (5, 10, 20 y 50 μ M) y se evaluó en un tiempo de 24 horas empleando el método Azul de Tripán. La tabla 1 muestra las repeticiones de los porcentajes de viabilidad celular en los diferentes sistemas.

De la tabla 1 se tiene que en el lapso de 24 horas la viabilidad en el cromo (VI) a la concentración de 5 y 10 μ M promueve una disminución significativa con respecto al control; pero el cromo (VI) a 20 μ M promueve una disminución más significativa de la viabilidad celular con respecto al control.

El cromo (VI) a 50 μ M produce menor viabilidad celular con respecto a los controles de todos los sistemas de estudio, lo que significa que la viabilidad celular disminuía a medida que se incrementaba la concentración de cromo (VI); se hizo en tres muestras iguales y paralelas teniendo de base un control.

En la figura 1, se observa una disminución de la viabilidad celular de hepatocitos conforme aumenta la concentración de cromo; es decir, que existe una relación inversa entre ambas variables.

Tabla 1. Viabilidad de hepatocitos frente a la exposición de concentraciones de cromo.

Tratamiento	1	2	3	Media	DS	Significancia
Control	90	92	90	90,67	$\pm 0,94$	SS
5 μ M	89	88	86	87,67	$\pm 1,24$	SS
10 μ M	87	85	84	85,33	$\pm 1,24$	SS
20 μ M	66	67	69	67,33	$\pm 1,69$	SS
50 μ M	51	48	47	48,67	$\pm 1,69$	SS
ANOVA				$P < 0,05$		

* Prueba de Tukey

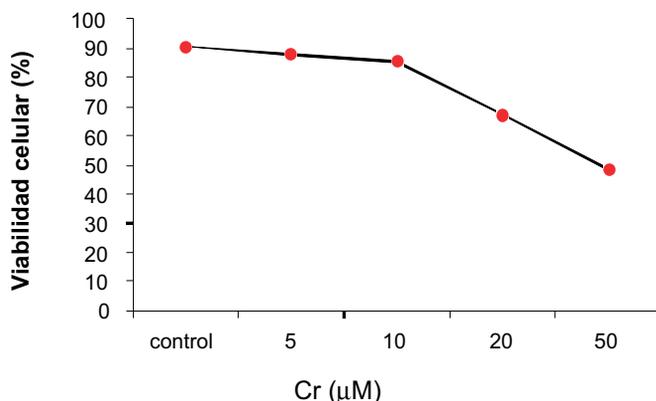


Figura 1. Curva dosis dependiente de la viabilidad celular de hepatocitos frente al cromo

Efecto del tiempo de incubación con cromo (VI) sobre la viabilidad celular de hepatocitos murinos

Se cultivó hepatocitos en medio RPMI-1640 en presencia de NaCl 0,9% (control) a una concentración de cromo (VI) 10 µM y se evaluó el porcentaje de viabilidad empleando el método de Azul de Tripán en tiempos de 1, 3, 6, 12, 24 horas.

Como se observa en la tabla 2, la viabilidad celular en diferentes lapsos de tiempo pero a igual concentración de cromo, a una hora, no presenta mucha diferencia con respecto al control; de igual manera a 3 y 6 horas de tiempo transcurrido. Al cabo de 12 horas la disminución en la viabilidad celular se hacía más significativa, y finalmente, al transcurso de 24 horas, la disminución de la viabilidad celular era más significativa de todos los sistemas de estudio.

Tabla 2. Respuesta tiempo dependiente de la viabilidad celular de hepatocitos frente al cromo 10 M

Tiempo	Tratamiento	Media	DS*	T-Student	Significancia
0 hr(1)	10 µM	91,67	±1,53	0,00	NS**
	Blanco	91,67	±1,53		
1 hr(2)	10 µM	88,00	±1,73	-5,29	SS
	Blanco	92,67	±0,58		
3 hrs(3)	10 µM	86,67	±2,08	-7,18	SS
	Blanco	93,00	±1,00		
6 hrs(4)	10 µM	86,67	±2,08	-5,00	SS
	Blanco	93,00	±0,58		
12 hrs(5)	10 µM	85,16	±0,58	-14,00	SS
	Blanco	99,21	±1,53		
24 hrs(6)	10 µM	78,00	±1,00	-12,09	SS
	Blanco	88,67	±0,58		
48 hrs(7)	10 µM	71,33	±0,58	-16,63	SS
	Blanco	86,00	±1,00		

* Desviación Estándar de cada uno de los tratamientos

** NS, no existe diferencias estadísticas significativas;

SS, sí existe diferencias estadísticas significativas

En la figura 2, se observa una disminución de la viabilidad de los hepatocitos conforme aumenta el tiempo de incubación, guardando una relación inversa entre ambas variables.

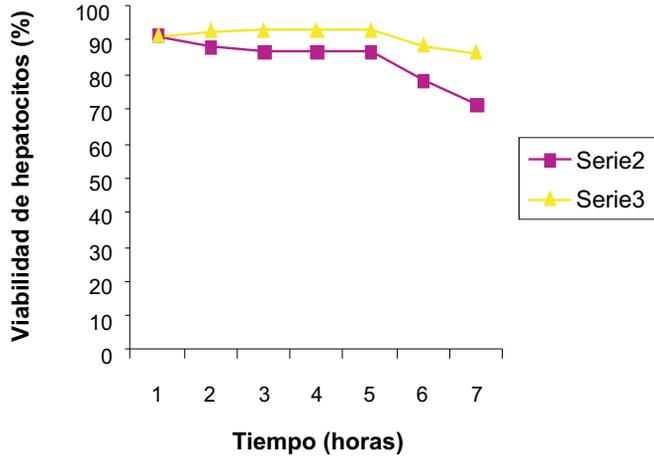


Figura 2. Curva tiempo dependiente de la viabilidad celular de hepatocitos frente al cromo.

Influencia del cromo (VI) sobre la fragmentación del ADN

Los hepatocitos en un número de 5×10^6 fueron incubados en presencia de NaCl 0,9 % (control) y a concentraciones variables (10, 20, 50 y 100 μM) de cromo (VI) por 24 horas.

El ADN aislado de los hepatocitos murinos de los diferentes sistemas fueron electroseparados en un gel de agarosa al 1,5%; los resultados en la figura 3 muestran que el NaCl 0,9% (control) no indujo la fragmentación del ADN, mientras que el tratamiento de células con cromo (VI) sí indujo la fragmentación, como lo muestra el patrón en escalera (ladder pattern) de los fragmentos de ADN múltiples de 180 pares de bases; los cuales son producto del clivaje internucleosomal propio del proceso apoptótico.

Las bandas del patrón en escalera del ADN se intensifican conforme aumenta la concentración de cromo (VI), como se puede observar en la línea que corresponde a 100 μM en donde la intensidad y número de los fragmentos es mayor con relación al control y los demás sistemas. Estos resultados sugieren que el cromo (VI) induce a la fragmentación del ADN en una manera dependiente de la concentración.

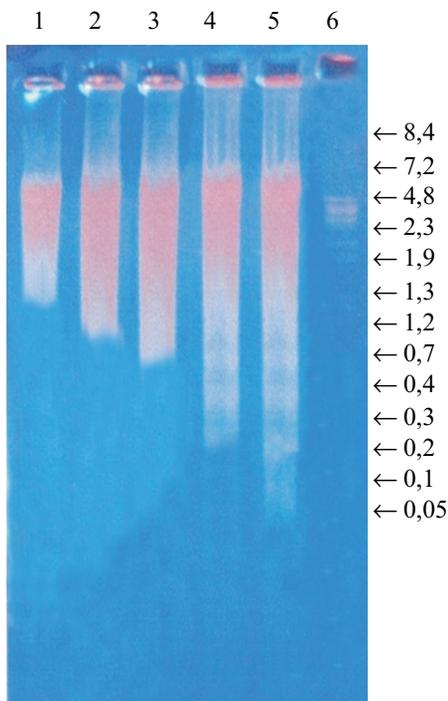


Figura 3. Gel de electroforesis del efecto del cromo (VI) sobre la fragmentación del ADN: Control (1); 10 μM (2); 20 μM (3); 50 μM (4); 100 μM (5); Marcador de peso molecular(6) cuyos valores van de alto a bajo rango en kilo bases (Kb).

Estudio de la expresión de p53

Fueron cultivados 5×10^6 células hepáticas en medio RPMI-1640 a concentraciones de 10, 20, 50 y 100 μM de cromo (VI); se realizó una extracción de proteínas totales y luego se separó en geles al 10% de poliacrilamida SDS-PAGE. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF), a la que se le agregó el anticuerpo contra la proteína p53 (anti-p53), y finalmente, se procedió al revelado quimio-luminiscente.

En la figura 4 se observa la expresión de la proteína p53; donde aparecen las bandas de expresión correspondientes a las concentraciones 10, 20, 50 y 100 μM de cromo (VI) las que se hacen más intensas a medida que la concentración aumenta, manteniéndose activas luego de 12 horas de evaluación.

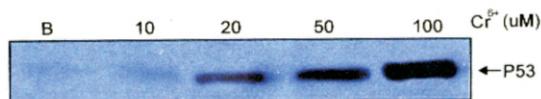


Figura 4. Western Blotting para expresión de p53. Números iguales de hepatocitos fueron incubados en medio RPMI-1640 a las concentraciones blanco 10, 20, 50, 100 μM de cromo (VI).

Resultados de cuantificación de óxido nítrico en hepatocitos

Un número de 5×10^6 hepatocitos fueron cultivados en medio RPMI-1640 a concentraciones de 10, 20, 50 y 100 μM de cromo (VI) durante 12 horas; luego se centrifugó y se midió 500 μL del sobrenadante y se mezcló con 500 μL del reactivo Greiss; observándose un cambio de color que fue de incoloro a violeta; se le dejó reposar 15 minutos y se realizó lecturas en el espectrofotómetro; los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración de óxido nítrico en hepatocitos murinos.

Sistema	1	2	3	Media	D S
Blanco	0,471	0,478	0,498	0,482	$\pm 0,011$
20	1,154	1,158	1,161	1,157	$\pm 0,002$
50	75,732	76,112	77,212	76,352	$\pm 0,627$
100	122,928	123,211	124,304	123,481	$\pm 0,593$

t-student $P < 0.05$: * t-student entre 20 μM y blanco

** t-student entre 50 μM y blanco

*** t-student entre 100 μM y blanco

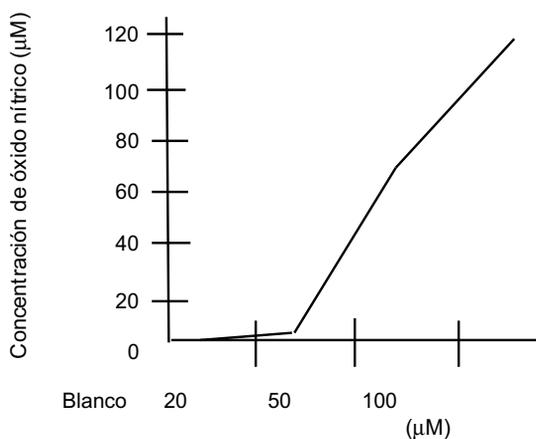


Figura 5. Curva dosis dependiente de cromo frente la concentración de óxido nítrico (NO) *in vitro*.

En la figura 5 se observa un incremento de radicales libres de óxido nítrico (NO) conforme aumenta la concentración de cromo.

En la tabla 3 y figura 5 se muestra los valores de óxido nítrico (NO) generados por los macrófago murinos, expuestos a diferentes concentraciones de cromo. Se puede apreciar que la producción de óxido nítrico guarda una relación directa con la concentración de cromo; obteniéndose la mayor producción de óxido nítrico (123,481 uM) para la concentración de 100 μ M de cromo

CONCLUSIONES

- El cromo (VI) disminuye la viabilidad celular de hepatocitos murinos expuestos a las concentraciones desde 5 a 100 μ M en una manera dependiente de la concentración.
- La proteína p53 se evidenció a partir de una concentración de 20 μ M de cromo (VI) incrementándose esta expresión a mayor concentración del metal.
- La fragmentación del ADN de hepatocitos murinos *in vitro* se observó a partir de concentraciones de 20 μ M de cromo (VI).
- El efecto del cromo (VI) en hepatocitos va acompañado de una producción de radicales de óxido nítrico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de San Agustín y a la Sociedad Química del Perú.

BIBLIOGRAFIA

1. Capo M. Principios de Ecotoxicología, Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. Madrid: Mc Graw Hill; 2002.
2. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Productos Químicos. 3ª ed. Madrid: Ministerio de trabajo y asuntos sociales; 2001.
3. Téllez Mosquera J, Carvajal Roxs M, Gaitan Ana M. Aspectos toxicológicos realcionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* 2004; 52 (1): 50-61.
4. Campbell M, Farrel S. Bioquímica. México: Thomson Editores; 2004. 352-353.
5. Voet D, Voet J. Bioquímica. Buenos Aires; Editora Médica Panamericana S.A. 2006. p. 1558.
6. Harvey L. Biología celular y molecular. Buenos Aires; Editora Médica Panamericana S.A. 2006. 958-961
7. Landolph J. Molecular mechanism of transformation of C3H/10T1/1C1 8 mouse cells and diploid human fibroblast by carcinogenic metal compounds. *Environmental Health Perspectives*. 1994; 102 (3): 119-124.
8. Manning C, Blankenship L, Wise J, Xu J, Bridgewater L, Patierno S. Induction of internucleosomal DNA fragmentation by carcinogenic chromate: relationship to DNA damage, genotoxicity, and inhibition of macromolecular synthesis. 1994; 102 (3):159-176.
9. Yu-I W, Shivendra D. Ethanol alters angiotensin II stimulated mitogen activated protein kinase in hepatocytes: agonist selectivity and ethanol metabolic independence. *European journal of pharmacology* 2000; 398(3):323-331.
10. Bernabé JC, Tejedo J, Rincón P, Cahuana G, Ramírez R, Sobrino F, and Bedoya F. Sodium nitroprusside-induced mitochondrial apoptotic events in insulin-secreting rnm5f cells are associated with map kinases activation. *Experimental cell Research*. 2001; 269: 222–229.

11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259):680-685.
12. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; (72): 248–254

ESTUDIO NUTRICIONAL DE *Plukenetia huayllabambana* sp. nov

Ana María Muñoz Jáuregui^{a*}, Carlos Alvarado-Ortiz Ureta^a, Benjamín Castañeda Castañeda^b, Frank Lizaraso Caparó^b, Edy Barnett Mendoza^c, Luis Cárdenas Lucero^c, Emma Manco Céspedes^d

RESUMEN

Se realizó el análisis de la composición nutricional de semillas de *Plukenetia huayllabambana* sp. nov, de dos accesiones de la Estación Experimental Agraria El Porvenir del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) ubicadas en el valle de Huallabamba, provincia de Rodríguez de Mendoza de la región Amazonas. Se realizaron contenido de humedad, cenizas, proteínas, lípidos, carbohidratos, fibra, ácidos grasos, magnesio, zinc, hierro, calcio según AOAC, y contenido de fitoesteroles según Fierro *et al.* Los resultados mostraron diferencia significativa en el contenido de grasa, proteínas y humedad. El mayor contenido de grasa fue 48,8% y humedad 7,84% en 02-A, mientras el mayor contenido de proteínas fue 21,13% en 01-A. Se encontró 44,06 mg/100 g de hierro, 38,78 mg/100 g de zinc y 149,53 mg/100 g de calcio en 01-A siendo las de mayor contenido y sus diferencias significativas ($p < 0,05$). Respecto al magnesio se encontraron 2492,00 mg/100 g en 02-A, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$). En aceite 28,47% de ácido linoleico y 9,8% de ácido oleico presentó 01-A, mientras 54% de ácido linolénico presentó 02-A, siendo de mayor contenido ($p < 0,05$). Asimismo, se encontró 208,48 mg/100 g de β -sitosterol en 01-A. Las semillas presentan alto contenido de proteínas, aceite y ácidos grasos poliinsaturados, de gran aporte nutricional.

Palabras clave: Aceite, ácidos grasos, micronutrientes, proteínas.

NUTRITIONAL STUDY OF *Plukenetia huayllabambana* sp. nov

ABSTRACT

Analysis was performed nutritional composition of seed of *Plukenetia huayllabambana* sp. nov., of two accessions from the Porvenir Agrarian Experimental Station of the National Institute of Agrarian Innovation (INIA) in the valley of Huallabamba, Rodríguez de Mendoza, province of Amazonas. There were moisture content, ash, protein, lipids, carbohydrates, fiber, fatty acids, magnesium, zinc, iron, calcium as AOAC, and content of phytoosterols as Fierro *et al.* The results showed significant differences in fat content, protein and moisture. The higher fat content was 48,8% and 7,84% moisture in 02-A, while the higher protein content was 21,13% in 01-A. Found 44,06 mg/100 g iron, 38,78 zinc and 149,53 mg/100 g calcium in 01-A be significant differences and higher content ($p < 0,05$). Regarding 2492,00 mg/100 g magnesium is found in 02-A showing significant differences ($p < 0,05$). In oil 28,47% linoleic acid and 9,8% oleic acid showed 01-A, while 54% of linolenic acid showed 02-A being more

^a Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición.

^b Centro de Medicina Tradicional Andina. Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres. Av. Alameda del Corregidor N° 1531. La Molina, Lima 12, Perú.

^c Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la USMP.

^d Instituto Nacional de Innovación Agraria. E-mail: amariamj@yahoo.es

content with significant differences ($p < 0,05$). Also found 208,48 mg/100 g of β -sitosterol in 01-A. The seeds have high protein and polyunsaturated fatty acid, great nutritional.

Key words: Oil, fatty acids, micronutrients proteins

INTRODUCCIÓN

La revista *Nordic Journal of Botany*, hace referencia y describe una nueva especie en el Perú que fue presentada y reportada a nivel mundial: *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. Pertenece al género pan tropical de lianas y enredaderas. Muestra características similares a *P. stipellata* L. J. Gillespie y *P. volubilis* L.¹, presentando esta última especie en su composición numerosos nutrientes, principalmente proteínas, aminoácidos, vitamina E, fitoesteroles, ácidos grasos esenciales omega 3, 6 y 9, estas últimas en cantidades elevadas siendo de importancia nutricional y terapéutica su consumo para el control de radicales libres y una serie de enfermedades crónicas².

Las investigaciones de los beneficios saludables de *Plukenetia volubilis* L., realizadas por Gorriti *et al*, concluyeron que no existe toxicidad alguna en ratas a las que se les administró por 60 días el aceite (0,5 mL/kg) y los estudios bioquímicos mostraron que disminuyeron los niveles de colesterol, triglicéridos e incrementaron el colesterol HDL con respecto al grupo control³. Por otro lado, Huamán *et al*, investigaron los efectos del consumo de *Plukenetia volubilis* L o “sacha inchi”, donde concluyeron que reduce los niveles de triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y aumenta los niveles de colesterol HDL en adultos jóvenes de 18 a 25 años⁴. Asimismo, Garmendia *et al*, determinaron que la ingesta del aceite produjo disminución en los valores promedio del CT, y AGNE con elevación del c-HDL en ambos grupos que consumieron 5 y 10 mL diarios de una suspensión conteniendo 2g/5mL de aceite de sacha inchi por cuatro meses en pacientes con hiperlipoproteinemia⁵.

Actualmente se comercializan como si fueran la misma especie, existiendo diferencias organolépticas y morfológicas entre ambas especies como se aprecia en las semillas de las figuras 1 y 2.

El presente estudio determinó el aporte nutricional que tiene *Plukenetia huayllabambana* sp. nov., realizando la composición proximal, contenido de minerales, ácidos grasos y fitoesteroles.



Figura1. Semilla de *Plukenetia huayllabambana* sp. nov.



Figura2. Semilla de *Plukenetia volubilis* L.

PARTE EXPERIMENTAL

En la colecta de la semilla se tuvo en consideración las características de producción reportadas sobre su adaptación a pisos agroecológicos de 1 300 – 2 200 m.s.n.m. Se realizó el muestreo en dos accesiones de la Estación Experimental Agraria “El Porvenir” del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), en la provincia de Rodríguez de Mendoza de la región Amazonas, específicamente en el valle de Huayllabamba. La colecta se llevó a cabo en 2 campos de cultivo con pendientes mayores al 15%, según se describe en la tabla 1, procediéndose luego a su acondicionamiento para su traslado a Lima.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico *Statgraphics Centurion*[®], aplicando un análisis de varianza (ANOVA); y en los casos donde existió diferencias significativas (con un nivel de significancia del 95%) para cada una las muestras evaluadas en cada análisis, se procedió a realizar un test de comparación múltiple aplicando la prueba de Duncan ($p < 0,05$)⁶.

Tabla 1. Zonas de colección de semillas de *Plukenetia huayllabambana* sp. nov.

Colecta	01-A
Accesión	Huayllabamba
Lugar	Rodríguez de Mendoza
Provincia	Rodríguez de Mendoza
Departamento	Amazonas
Donante	Sr. Alfonso Saldaña Peláez
Fundo	El Mirador cerca al Cielo
Fecha de cosecha	30/04/11 y 05/05/11
Estado de plantación	Un año y medio
Tipo de tutor	Vivo
Datos GPS	18 225578 9293058 1708
Cantidad adquirida	25 kg
Colecta	02-A
Accesión	Huayllabamba
Lugar	Sector Omia - Rodríguez de Mendoza
Provincia	Rodríguez de Mendoza
Departamento	Amazonas
Donante	Sr. Maurilio Loja Pizarro
Fundo	Limón Loma
Fecha de cosecha	29/04/2011
Estado de plantación	Dos años
Tipo de tutor	Espalderas con alambre
Datos GPS	18 234294 9285958 1460
Cantidad adquirida	25 kg

Preparación de la muestra

La extracción del aceite de las semillas se llevó a cabo por el prensado en frío. Las presiones a las que se sometió la extracción fueron de 300 a 700 psi, por espacio de 5 minutos, a temperatura ambiente. Las extracciones se llevaron a cabo con muestras de 90 g. Las muestras fueron colocadas en cilindro extractor de acero inoxidable, sometiéndose lentamente hasta llegar a las presiones establecidas, manteniendo la palanca de activación a presión constante por espacio de 5 minutos. Después de la extracción de las almendras prensadas fueron deshidratadas a temperaturas de 45 °C por dos horas. Posteriormente las semillas fueron pulverizadas por un **maxi chopper** (picadora); el pulverizado de la torta obtenida fue pasado por un tamiz de 600 µm.

Determinación de humedad

Se determinó exactamente en una masa de 5 g de la muestra, con aproximación de 0,1 mg, en placa petri previamente secada y tarada, se llevó a la estufa a 105 °C, hasta peso constante, según el método de la AOAC N° 935.29 o mét. 27.3.06 - 16th Ed⁷.

Determinación de proteínas

Se determinaron a través del método macro Kjeldahl, con sulfato de sodio, sulfato de cobre pentahidratado y selenio en relación 10:1:0,1, como mezcla catalizadora para la digestión, usando el Método AOAC 991.200 mét. 33.2.11 -16thEd⁷.

Determinación de grasa cruda

Se efectuó siguiendo el método del Soxhlet, con éter de petróleo como solvente extractor, siguiendo el Método AOAC 920.39⁷. Se pesó 10,000g ± 0,001 de muestra molida y seca y se colocó en el cartucho de extracción en el sifón. Se calentó a través de manta calefactora durante 4 h., luego retiró y se evaporó gran parte del disolvente. Se dejó enfriar en el desecador y, una vez alcanzada la temperatura ambiente se determinó el peso.

Determinación de fibra cruda

Se determinó la fibra cruda según AOAC 962.09/90⁷. Se extrajo la grasa de la muestra con éter de petróleo hasta que el solvente quede incoloro. Luego se secó la muestra, la que fue transferida a un vaso de 600 mL. Se añadieron 200 mL de solución de ácido sulfúrico caliente y se hirvió durante treinta minutos. Fue filtrado en caliente, utilizando el papel filtro y lavado el residuo con agua caliente destilada, hasta neutralidad del líquido lavado. Luego se transfirió el residuo a otro vaso de 600 mL y se añadió 200 mL de la solución de hidróxido de sodio al 1,25%. Se hirvió durante treinta minutos, se filtró en caliente y luego lavado hasta pH neutro. Inmediatamente fue lavado con por lo menos dos porciones de 100 mL de alcohol etílico de 96% y secado en estufa a 130 °C. Se dejó enfriar en desecador y se midió la masa constante.

Determinación de ceniza

Se ejecutó según AOAC N° 968.08-16th Ed⁷. Se calcinó en crisoles a 600 °C, durante 15 minutos, se enfrió en un desecador y se determinó la masa. Una masa de 1 g de la muestra molida, seca y libre de grasa, fue calcinado en una mufla a una temperatura 550 °C, hasta obtener cenizas blancas, libres de carbono, por 2 horas, aproximadamente, hasta masa constante. Se enfrió en un desecador hasta temperatura ambiente y se pesó. La diferencia de masa obtenida indicó el contenido de ceniza de la muestra.

Determinación de minerales

La suspensión de las cenizas para la determinación de minerales se hizo con ácido nítrico 6N y 3N. Se transfirió a matraces volumétricos de 100 mL, llevados a volumen con agua

bidestilada. Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Carl Zeiss con lámparas de cátodo hueco de cobre, zinc, calcio y hierro, según el método AOAC 965.09⁷.

Determinación de ácidos grasos

Los ácidos grasos del aceite han sido analizados por cromatografía de gases (GC) utilizando como referencia el método propuesto por la AOAC⁷ para la preparación e identificación de ésteres metílicos (FAMES) de ácidos grasos. Se pesó 25 mg de aceite en un tubo de base plana con tapa rosca. Inmediatamente se adicionó 5 mL de NaOH 0,5 N en metanol grado GC con adición constante de N₂, la mezcla fue puesta a 100 °C por 5 min. Luego se colocó en frío y se adicionó 2 mL de trifluoruro de boro (BF₃) en metanol, en presencia de N₂. La mezcla fue llevada a 100 °C por 30 min. Luego se disminuyó la temperatura entre 30 a 40 °C y se añadió 1 mL de isooctano en presencia de N₂, vorteamos vigorosamente por 30 segundos. Después de añadir 5 mL de NaCl saturado, en presencia de N₂, fue agitado vigorosamente y se dejó en reposo para separar las fases, seguidamente fue transferido el sobrenadante a un tubo cónico en presencia de N₂, repitiendo tres veces la extracción. Los sobrenadantes fueron juntados y evaporados hasta aproximadamente 1 mL, se filtró y colocó en viales del automuestreador.

Para la cuantificación de los ácidos grasos se utilizó un equipo de cromatografía de gases Agilent modelo AT-6850. Equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar de Supelco SPTM-2380 de sílice fundida de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno un espesor de fase de 0,2 µm, con inyector programable split-splitless (PSSI).

Las condiciones del análisis fueron a una temperatura de inyección 250 °C, temperatura del detector 275 °C. La programación del horno: temperatura de inicio 50 °C, rampa 4 °C/min hasta 250 °C, manteniéndose por 15 minutos. Se utilizó gas de arrastre helio de 99,99 % de pureza, a una velocidad 1 mL/min, con un sistema de inyección modo Split, a una proporción 1:20.

Determinación del contenido de esteroides

Se realizó por cromatografía de alta performance HPLC según Fierro *et al.*⁸. El tratamiento de muestra se ejecutó según Consejo Oleico Internacional. COI/T.20/Doc. N°30. Se pesó 5 g de muestra seca, luego se añadió 50 mL de solución etanólica de hidróxido potásico 2 N y algo de piedra pómez, se llevó a reflujo a ebullición suave hasta que tenga lugar la saponificación. Luego de 30 min de ebullición se adicionó 50 mL de agua destilada. Se añadió aproximadamente 80 mL de éter etílico en una pera de decantación, realizando tres extracciones. Se combinó las tres extracciones de éter en una pera de decantación que contenga 50 mL de agua. Se procedió a lavar con agua hasta pH neutro, luego se filtró con sulfato sódico anhidro. Inmediatamente se concentró en rotavapor a 30 °C al vacío. De allí fue reconstituido en 2 mL de metanol HPLC y filtrado usando Acrodisk[®] de jeringa y colocado en viales de cromatografía para su análisis por HPLC en el equipo HPLC Merck-Hitachi Lachrom 7000, usando columna RP Symmetry C18, tamaño de partícula 5,0 µm; de longitud 4,6 mm x 250 mm, usando una fase móvil ACN:METH (65:35) con flujo 1,2 mL/min y longitud de onda de 215 nm en sistema isocrático.

RESULTADOS Y DISCUSION

Composición de macronutrientes en semillas de los ecotipos de *Plukenetia huallabambana* sp. nov.

Los métodos de secado son los más comunes para valorar el contenido de humedad en los alimentos; aunque estos métodos dan buenos resultados que pueden interpretarse sobre bases

de comparación, es preciso tener presente que a) algunas veces es difícil eliminar por secado toda la humedad presente; b) a cierta temperatura el alimento es susceptible de descomponerse, con lo que se volatilizan otras sustancias además de agua (Kirk *et al.*, 1996)⁹. Con respecto a los resultados, las semillas en la tabla 2 presentan mayor humedad en 02-A (7,84%) superior a los valores obtenidos en *P. volubilis* L (3,3%)¹⁰.

Las cenizas normalmente, no son las mismas sustancias inorgánicas presentes en el alimento original, debido a las pérdidas por volatilización o a las interacciones químicas entre los constituyentes. Las cenizas de los alimentos deberán estar comprendidas entre ciertos valores, lo cual facilitará en parte su identificación (Kirk *et al.*, 1996)⁹. En cuanto a cenizas 01-A (2,36%), presenta mayor contenido pero inferior a los reportados en *P. volubilis* L (4%)¹⁰.

En grasas se halló hasta 48,84% en la 02-A, superior al contenido a *P. volubilis* L (42%)¹⁰. En cuanto a proteínas se halló 21,13% en 01-A mientras Sathe *et al.*, en *P. volubilis* L encontraron 25% en semilla desengrasada¹¹.

Tabla 2. Contenido de macronutrientes en semillas de *Plukenetia huallabambana* sp. nov.

Análisis		01-A%	02-A%
grasa	prom	45,87	48,84
	d.s.	0,10	0,84
	c.v.	0,22	1,72
	Duncan	a	b
proteínas	prom	21,13	20,33
	d.s.	0,05	0,02
	c.v.	0,23	0,10
	Duncan	b	a
humedad	prom	4,82	7,84
	d.s.	0,09	0,10
	c.v.	1,91	1,26
	Duncan	a	b
cenizas	prom	2,36	2,30
	d.s.	0,05	0,01
	c.v.	2,10	0,61
	Duncan	a	a
fibra	prom	2,62	2,63
	d.s.	0,05	0,04
	c.v.	2,10	1,43
	Duncan	a	a
ELN carbohidratos	prom	25,84	20,7

Valores promedio obtenido por análisis triplicado. Test de comparación múltiple, aplicando la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Letras diferentes indican que son muestras estadísticamente diferentes.

Contenido de hierro, calcio, zinc y magnesio

Los minerales que se encuentran en los alimentos en algunos casos estos elementos son naturales en los alimentos mientras que en otros casos son producto de la contaminación. En la semilla de *P. volubilis* L se halló 32,1 mg/100 de magnesio, 240,6 mg/100 de calcio, 10,3 mg/100 de hierro y 4,9 mg/100 de zinc¹⁰. Según la tabla 3 se debe destacar el gran aporte de *P. huayllabambana* sp. nov. en hierro (44,06 mg/100 g), zinc (38,78 mg/100 g) en 01-A y magnesio (2492mg/100 g) en 02-A.

Tabla 3. Contenido de fierro, zinc, calcio y magnesio en semillas de *Plukenetia huallabambana* sp. nov.

Análisis de minerales		01-A mg/100g	02-A mg/100g
Hierro	prom	44,06	39,55
	d.s.	0,01	0,21
	c.v.	0,03	0,52
	Duncan	a	b
Zinc	prom	38,78	33,74
	d.s.	0,25	0,06
	c.v.	0,64	0,17
	Duncan	b	a
Calcio	prom	149,53	116,48
	d.s.	3,27	0,14
	c.v.	2,18	0,12
	Duncan	a	b
Magnesio	prom	2446,09	2492,00
	d.s.	6,42	5,66
	c.v.	2,63	0,23
	Duncan	a	a

Valores promedio obtenido por análisis triplicado. Test de comparación múltiple, aplicando la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Letras diferentes indican que son muestras estadísticamente diferentes.

Contenido de ácidos grasos

En la tabla 4, existe diferencia significativa en el contenido de los ácidos palmítico, oleico(9,8%) y linoleico (28,47%) entre las dos accesiones estudiadas, encontrándose mayor contenido en el 01-A, siendo el ácido graso más abundante el linolénico (54%) presente en mayor concentración en el 02-A.

Según la Norma Técnica Peruana (NTP 151.400:2009) para el aceite extraído de la semilla de sachá inchi del género *Plukenetia*, el perfil de ácidos grasos del aceite de *Plukenetia volubilis* L., debe contener 8,9% de ácido graso oleico, 32,1% de ácido graso linoleico y 44,7% de ácido graso linolénico¹².

Tabla 4. Contenido de ácidos grasos en el aceite de la semilla de *Plukenetia huallabambana* sp. nov.

Perfil de ácidos grasos	01-A				02-A				
	prom	d.s.	c.v.	Duncan*	prom	d.s.	c.v.	Duncan*	
Palmítico	C16:0	5,36	0,007	0,13	b	5,16	0,007	0,14	a
Palmitoleico	C16:1	0,05	0,000	0,00	a	0,05	0,000	0,00	a
Heptadecanoico	C17:0	0,07	0,000	0,00	a	0,07	0,000	0,00	a
Esteárico	C18:0	2,41	0,007	0,29	b	2,17	0,000	0,00	a
Oleico	C18:1	9,80	0,000	0,00	b	9,33	0,007	0,08	a
Linoleico	C18:2	28,47	0,014	0,05	b	28,09	0,007	0,03	a
Linolénico	C18:3	52,67	0,042	0,08	a	54,00	0,000	0,00	b
Araquídico	C20:0	0,10	0,000	0,00	b	0,09	0,000	0,00	a
Eicosenoico	C20:1	0,27	0,000	0,00	a	0,27	0,000	0,00	a
AG saturado		7,93	0,014	0,18	b	7,49	0,007	0,09	a
Monoinsaturado		10,12	0,000	0,00	b	9,65	0,007	0,07	a
Poliinsaturado		81,14	0,057	0,07	a	82,09	0,007	0,01	b
No identificados		0,81	0,042	5,24	a	0,79	0,007	0,90	a

*Test de comparación múltiple, aplicando la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Letras iguales indican que son muestras estadísticamente similares, mientras que letras diferentes indican que son muestras estadísticamente diferentes.

Contenido de fitosteroles

En la tabla 5, existen diferencias significativas en el contenido de estigmasterol y β -sitosterol, destacando el contenido de β -sitosterol (237,49 mg/100 g) en el 02-A.

El aceite de sacha inchi contiene 247,2 mg/100 g de esteroides vegetales, siendo los componentes mayoritarios: sitosterol, estigmasterol y el campesterol¹³ (figura 3).

Tabla 5. Contenido de stigmasterol y β -sitosterol de las muestras de *Plukenetia huallabambana* sp nov.

Muestra	stigmasterol (mg/100 g)			β -sitosterol (mg/100 g)		
	prom	d.s.	Duncan	prom	d.s.	Duncan
01-A	188,40	4,97	a	208,48	0,21	c
02-A	205,40	3,59	b	237,49	0,11	d

*Test de comparación múltiple, aplicando la prueba de Duncan ($p < 0,05$). Letras iguales indican que son muestras estadísticamente similares, mientras que letras diferentes indican que son muestras estadísticamente diferentes.

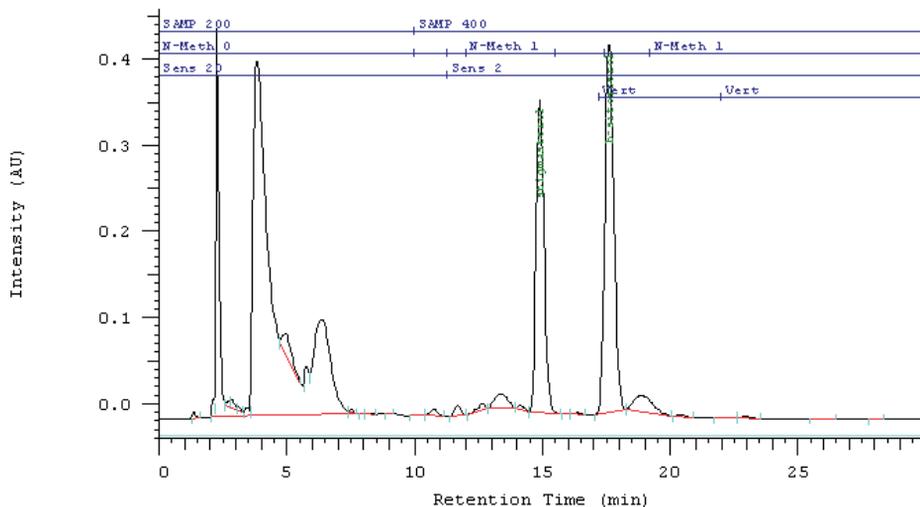


Figura 3. Cromatograma del contenido de stigmasterol y β -sitosterol en semilla de *Plukenetia huayllabambana* sp. nov.

CONCLUSIONES

Plukenetia huayllabambana sp. nov. presenta alto contenido de aceite superior a *Plukenetia volubilis* L, con elevadas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, constituidos principalmente por ácidos linolénico y linoleico considerados como ácidos grasos esenciales, y en menor contenido ácido oleico, siendo el ácido linolénico de mayor contenido en el aceite de *P. huayllabambana* sp. nov. que en el aceite de *P. volubilis* L.

Las semillas de *P. huayllabambana* sp. nov. presentan un gran aporte de minerales como hierro, calcio, zinc y magnesio. Además, contiene un alto contenido proteico y de fitosteroles, sobre todo de β -sitosterol. Es una especie con gran aporte nutricional para la alimentación mundial.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad San Martín de Porres y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTEC por el apoyo económico recibido en la ejecución de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bussmann, R., Tellez, C., Glenn A. *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Perú, *Nordic Journal of Botany*, 2009; 27(4):313-315.
2. Muñoz A., Ramos F., Ortiz-Ureta C., *et al.* Evaluación del contenido de fitosteroles, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en semilla de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Rev. Soc. Quím. Perú*, 2010; 76(3):234-241.

3. Gorriti a., Arroyo J., Quispe F., *et al.* Toxicidad oral a 60 días del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y linaza (*Linum usitatissimum* L.) *Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública.* 2010; 27(3): 352-60.
4. Huamán J., Chávez K., Castañeda E., *et al.* Efecto de la *Plukenetia volubilis* Linneo (sachá inchi) en la trigliceridemia posprandial *An. Fac. med.*, 2008; 69(4): 263-266.
5. Garmendia F., Pando R., Ronceros G. Efecto del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sobre el perfil lipídico en pacientes con hiperlipoproteíнемia, *Rev. peru. med. exp. salud pública*, 2011; 28(4): 628-632.
6. Vargas A. Estadística descriptiva e inferencial. Univ de Castilla La Mancha, España, 1995.
7. Association of Official Agricultural Chemists AOAC 16th Ed. Washington, 1995.
8. Fierro A., Vásquez Y., Reyes-Parada M., Sepúlveda-Boza S. Determinación cuantitativa del β -sitosterol presente en vegetales de la dieta. Posibles implicancias para su uso preventivo en poblaciones susceptibles, *Clínica y Ciencia*, 2004; 2(2):43-48.
9. Kirk R. S., Sawyer R., Egan H. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Compañía editorial continental SA de CV, México, 1996.
10. Gutiérrez L., Rosada L., Jiménez A. Chemical composition of sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction, *Rev. Grasas y aceites*, 2011;62(1):76-83.
11. Sathe S., Hamaker B., Sze-Tao K., Venkatachalam M. Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.). *J. Agric Food Chem.* 2002; 50(17): 4906-4908
12. Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales No Arancelarias-INDECOPI. Norma Técnica Peruana NTP 151.400:2009: Aceite de Sachá Inchi del género *Plukenetia*.- Requisitos. 2009.
13. Bondioli P., Della Bella L., Rettke P. Alpha linolénic acid rich oils. Composition of *Plukenetia volubilis* L (Sachá Inchi) oil from Perú. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse.* 2006; 83(3):120-123

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus* L.)

Martín Cruzado¹, Ana Pastor¹, Nino Castro¹ y Juan Carlos Cedrón^{2*}

RESUMEN

Como parte de un proyecto con la empresa Danper Perú, se evaluó el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de diversos extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.), cultivada en el norte del Perú (provincia de La Libertad). El contenido de compuestos fenólicos expresados como mg de ácido gálico varía entre 93 y 117 mg por gramo de muestra, dependiendo del tipo de extracto analizado y de la forma de ser procesado. La actividad antioxidante de un gramo de la muestra con mayor contenido de compuestos fenólicos es comparable a la actividad de 47 mg de ácido gálico.

Palabras clave: Actividad antioxidante, fenoles totales, extracto de alcachofa, ácido gálico.

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ARTICHOKE EXTRACTS (*Cynara scolymus* L.)

ABSTRACT

As a part of a project with Danper Peru, the content of phenolic compounds and the antioxidant activity of several artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts have been evaluated. The total content of phenolic compounds, expressed as mg of gallic acid was between 93 and 117 mg per gram of extract, depending on the sample and processing. The antioxidant activity of one gram of the sample with the highest amount of phenolic compounds was comparable to the activity of 47 mg of gallic acid.

Keywords: Antioxidant activity, total phenols, artichoke extract, gallic acid.

INTRODUCCIÓN

La alcachofa es una planta perteneciente al género *Cynara*, de reconocido uso alimenticio a lo largo de la historia, que se cultiva en países con climas templados, tales como Italia, España, Egipto y Marruecos.¹ La alcachofa contiene numerosos compuestos químicos de reconocida actividad farmacológica, tales como hepatoprotectora, colerética, diurética, antioxidante, entre otras.^{2,3} Este hecho, acompañado de su alto valor alimenticio, ha permitido que esta planta sea una de las más consumidas en su género.⁴ La especie *Cynara scolymus* L. se cultiva en diferentes zonas de la costa y sierra del Perú, y se ha convertido en los últimos años en un producto de exportación de bandera de nuestro país.

Del proceso industrial de la elaboración de corazones de alcachofa se obtienen diversas soluciones residuales, a partir de las cuales se preparan ingredientes para la industria alimentaria y farmacéutica.⁴ Debido al creciente interés por los productos naturales

¹ Pontificia Universidad Católica del Perú. Sección Química. Av. Universitaria 1801, Lima 32 - Perú.

² Universidad de Ingeniería & Tecnología (UTEC). Av. Cascanueces 2281 Santa Anita, Lima 43 - Perú.
jcedron@utec.edu.pe, mail@jccedron.com

antioxidantes, que logran evita efectos dañinos de los radicales libres en nuestro organismo⁵, nace el interés de determinar la actividad antioxidante en el extracto de alcachofa.⁶

Se considera este trabajo como el primer estudio que evalúa la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de la alcachofa realizado en Perú. La literatura internacional reporta este tipo de estudios en otras especies de alcachofas.⁷

PARTE EXPERIMENTAL

Determinación de compuestos fenólicos totales en el extracto de alcachofa

La determinación de fenoles se realizó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, la cual se basa en la propiedad de los fenoles de reaccionar frente a agentes oxidantes. Este reactivo contiene molibdato y tungstato sódico que al reaccionar con los compuestos fenólicos presentes, forman complejos fosfomolibdico - fosfotúngstico. En medio básico la transferencia de electrones reduce estos complejos a óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), cromógenos de color azul intenso que son proporcionales a la cantidad de grupos fenólicos presentes en la molécula de interés.^{8,9,10}

La lectura de la absorbancia del complejo se realizó a 760 nm en un espectrómetro ultravioleta - visible. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (patrón). Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico equivalentes por gramo de extracto de alcachofa.¹¹

Materiales y reactivos

Solución patrón: ácido gálico 0,1 g/L

Solución de carbonato de sodio al 20% (w/v).

Reactivo Folin-Ciocalteu 1N.

Preparación de muestras

- La solución acuosa obtenida de la cocción a 70 °C de corazones de alcachofa fue liofilizada. El extracto liofilizado se denominó **M1**.
- La solución acuosa obtenida de la cocción a 70 °C de hojas picadas y licuadas de alcachofa fue liofilizada. El extracto liofilizado se denominó **M2**.
- La solución acuosa obtenida de la cocción a 70 °C de corazones de alcachofa fue filtrada (filtro 5 µm), para después ser liofilizada. El extracto liofilizado se denominó **M3**.
- La solución acuosa obtenida de la cocción a 70 °C de hojas picadas y licuadas de alcachofa fue filtrada (filtro 5 µm), para después ser liofilizada. El extracto liofilizado se denominó **M4**.

Preparación de curva de calibración

A partir de la solución patrón de ácido gálico de 0,1 g/L, se procedió a realizar una serie de diluciones con agua destilada para obtener concentraciones de 1, 1,5, 2, 3 y 4 mg/L. Para ello se colocó en distintos viales protegidos de la luz 20, 30, 40, 60 y 80 µL de la solución patrón antes descrita. A cada vial se le adicionó 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, se agitó y luego se agregó 0,75 mL de carbonato de sodio al 20%. La mezcla se llevó a volumen final de 2 mL usando agua destilada y se dejó reposar por 2 h. Finalmente, se tomó la lectura en el espectrofotómetro UV a 760 nm. El blanco tuvo los mismos componentes excepto el ácido gálico.⁸

Determinación de fenoles

Se procedió a pesar 2 mg de cada uno de los extractos liofilizados, el cual se disolvió en 50 mL de agua destilada. Se tomó 0,5 mL de la disolución a la cual se le adicionó 0,75 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N. Se dejó reposar alrededor de 5 minutos y se adicionó 0,75 mL de carbonato de sodio al 20%. Se agitó y se dejó reposar por 2 h. Se analizó por UV-V a 760 nm.⁸

Determinación de la actividad antioxidante en el extracto de alcachofa

El radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) posee un electrón desapareado, lo cual le confiere un color violeta observado en la respectiva banda de absorción alrededor de los 517 nm.^{8,12} El parámetro que se midió es el porcentaje de reducción del DPPH (Q) frente a la muestra, llamado también de inhibición.¹³

Se define Q como:

$$Q = \left(1 - \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Donde:

A_{muestra} = absorbancia de la muestra

A_{control} = absorbancia del reactivo DPPH

Materiales y reactivos

Solución de DPPH de 150 $\mu\text{mol/L}$ en metanol/ H_2O 4:1. Esta solución fue preparada antes de cada uso.

Solución patrón: se realizó un control positivo con ácido gálico, para lo cual se preparó ocho diluciones del ácido en el rango de 45 – 0,1 mg/mL.

Preparación de la solución problema: se disolvió 2 g de la muestra en 10 mL de metanol/ H_2O 4:1. La solución se filtró y se preparó siete soluciones diluidas en el rango de 200 - 5 mg/mL de muestra.

Determinación de la actividad antioxidante

Se tomó 0,2 mL de cada dilución de la muestra problema **M1** en viales de 10 mL protegidos de la luz, y se adicionó 2 mL de la solución de DPPH. Se agitó y luego se dejó en reposo durante 30 minutos. Finalmente, se leyó en el espectrofotómetro UV - V a 517 nm.

Se realizó el mismo procedimiento para la solución patrón de ácido gálico usado como estándar.

Finalmente, se determinó el porcentaje de reducción del DPPH (Q), tanto para la muestra M1 (extracto de alcachofa), como para las diluciones de ácido gálico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Determinación del contenido de fenoles totales**

Se midió la absorbancia de las soluciones de ácido gálico patrón (ver tabla 1). Con estos datos se elaboró la curva patrón respectiva (figura 1).

Tabla 1. Absorbancias del estándar de ácido gálico a 760 nm

Concentración (mg/L)	Absorbancia promedio
1,0	0,0316 \pm 0,005
1,5	0,0594 \pm 0,001
2,0	0,1070 \pm 0,006
3,0	0,2215 \pm 0,003
4,0	0,3251 \pm 0,004

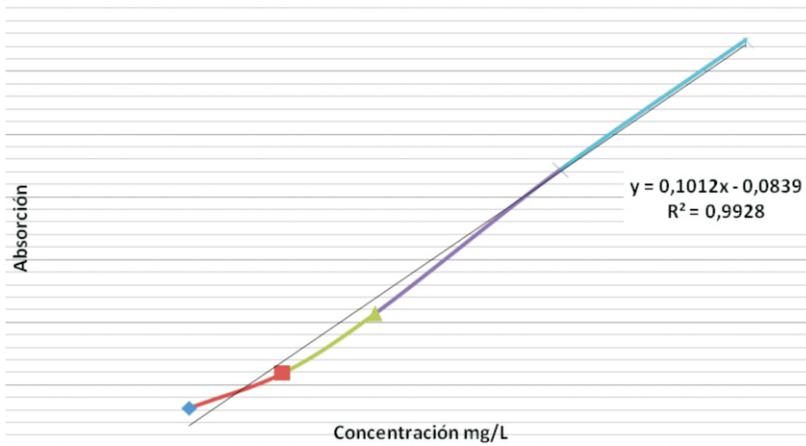


Figura 1. Curva de calibración del ácido gálico

Empleando la siguiente fórmula se relacionó la concentración de ácido gálico con la absorbancia:

$$[\text{Ácido gálico}] = \frac{\text{Absorbancia} + 0,0839}{0,1012}$$

Para el análisis se utilizó las muestras liofilizadas M1, M2, M3 y M4. Las dos primeras (M1 y M2) son muestras sin previo tratamiento, en cambio M3 y M4 fueron microfiltradas.

En la tabla 2 se observa la equivalencia entre la absorbancia promedio de las muestras con la concentración de ácido gálico obtenida de la ecuación proveniente de la curva de calibración del respectivo ácido. Luego, en la última columna se ha expresado el porcentaje equivalente de ácido gálico en el extracto sólido

Tabla 2. Resultados de fenoles totales en los extractos de alcachofa liofilizados

Muestra	Peso (mg)	Absorbancia promedio	Concentración ácido gálico (mg/L)	% equivalente de ácido gálico en el extracto
M1	3,1	0,1002 ± 0.001	1,8192	11,7
M2	2,0	0,0206 ± 0.002	1,0326	10,3
M3	2,2	0,0200 ± 0.003	1,0266	9,3
M4	2,7	0,0461 ± 0.001	1,2845	9,5

De las muestras analizadas, M1 y M2 son las que presentaron una mayor concentración de fenoles totales. Dado que M1 y M2 proceden de soluciones del proceso de cocción de alcachofa y no tienen ningún tratamiento adicional, podemos concluir que el proceso de microfiltración disminuye la concentración de fenoles totales debido a la pérdida de este tipo de compuestos.

Al comparar los valores obtenidos con las de otras variedades de alcachofas (3.1 – 5.8% de compuestos fenólicos) recopilados de la bibliografía¹⁴, se concluye que los distintos extractos de alcachofa tienen una alta concentración de fenoles totales, destacando M1 con 11,7%.

Determinación de la actividad antioxidante

La tabla 3 resume las absorbancias promedio y el porcentaje de inhibición de DDPH (Q) dependiendo de la concentración de ácido gálico (mg/mL).

Tabla 3. Absorbancias promedio y valor de Q del ácido gálico

Concentración ácido gálico (mg/mL)	Absorbancia promedio	Q (%)
0	0,5012 ± 0,009	0
0,1	0,4133 ± 0,007	17,5
0,25	0,3839 ± 0,008	23,4
0,5	0,3571 ± 0,005	28,8
1	0,3374 ± 0,007	32,7
5	0,2694 ± 0,001	46,2
10	0,2337 ± 0,003	53,4
30	0,1956 ± 0,005	61,0
45	0,1872 ± 0,001	62,6

Para el análisis de la actividad antioxidante se eligió la muestra M1, dado que era la que presentaba la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales. En la tabla 4 se presenta las absorbancias promedio de la muestra M1. De este promedio se obtiene el porcentaje de inhibición de DDPH de las distintas concentraciones de M1.

Tabla 4. Resultados de la absorbancia promedio y valor de Q de M1

Concentración de M1 (mg/mL)	Absorbancia promedio	Q (%)
0	0,6544 ± 0,009	0
5	0,5599 ± 0,006	14,4
10	0,5483 ± 0,006	16,2
25	0,5382 ± 0,030	17,8
50	0,4788 ± 0,030	26,8
100	0,3768 ± 0,010	42,4
150	0,3451 ± 0,010	47,3
200	0,3225 ± 0,009	50,7

Se observó que la muestra M1 consumió el 50% de reactivo DPPH a una concentración cercana a 200 mg/mL, mientras que el ácido gálico consumió el 50% de reactivo DPPH a una concentración aproximada de 9,5 mg/mL. Por lo tanto, un gramo de alcachofa liofilizada tiene la actividad antioxidante de 47 mg de ácido gálico, valores comparable con los obtenidos en otros estudios realizados con la alcachofa.¹⁵

CONCLUSIONES

- El contenido de fenoles totales del extracto de alcachofa de la especie *Cynara scolymus* L. alcanzó ser de 117,3 mg de ácido gálico/g de extracto. Este valor resultó ser mayor que en otras especies de alcachofas reportadas (31 - 58 mg de ácido gálico/g de extracto). Se encontró las mayores concentraciones de fenoles en muestras que no fueron microfiltradas, concluyendo que este proceso reduce la concentración de fenoles en los extractos de alcachofa.
- Se logró determinar la actividad antioxidante en el extracto liofilizado de alcachofa con mayor contenido de compuestos fenólicos, mediante el empleo del reactivo DPPH. Se obtuvo un valor de CI_{50} a una concentración de 200 mg/mL, lo cual es comparable a una actividad antioxidante de 47 mg de ácido gálico.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de ciencia y tecnología FINCYT (Contrato N° 162-FINCYT-FIDECOM-PIPEI-2010) por el financiamiento del proyecto de investigación.

Al personal de la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por las facilidades otorgadas en el uso de las instalaciones y equipos.

REFERENCIAS

1. Sonnante G, Pignone D, Hammer K. The domestication of artichoke and cardoon: from Roman times to the genomic age. *Ann. Bot.* 2007; 100(5): 1095-1100.
2. Lattanzio V, Kroon P, Linsalata V, Cardinali A. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*. [en línea] 2009 [consultado el 22 de abril del 2011]; 1: 131-144. Disponible en: www.sciencedirect.com

3. Ruepp M. Use of artichoke (*Cynara*) extracts. Patente US 0012708 A1. 31-1-2002
4. Rodríguez J. Aprovechamiento de residuos de alcachofa. [en línea] (s.f) [Consultado el 11 de julio del 2011]. Disponible en: [http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6303/1/Aprovechamiento de Residuos de Alcachofa-Aspectos Teóricos.pdf](http://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/6303/1/Aprovechamiento%20de%20Residuos%20de%20Alcachofa-Aspectos%20Teoricos.pdf).
5. Ramos E, Castaneda B, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Peru Salud*. 2008; 15 (1): 42-46.
6. Wang M, Simon J, Avilés I, He Kan, Zheng Q, Tadmor Y. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara Scolymus* L.) *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51 (3): 601-608.
7. Fratianni F, Tucci M, De Palma M, Pepe R, Nazzaro F. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori). *Food chemistry*. [en línea] 2007 [consultado el 8 de setiembre del 2012]; 104: 1282-1286. Disponible en: www.sciencedirect.com.
8. Gutiérrez D, Ortiz C, Mendoza C. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México. Del 22 al 24 de octubre del 2008.
9. Ávalos K, Sgroppo S, Avanza J. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en vinos de origen nacional. *Facena*. 2003; 19: 11-19.
10. Fukumoto L, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem*. 2000; 48 (8): 3597-3604.
11. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Merillon J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem*. 2009; 57 (5): 1768-1774.
12. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technol*. 1995; 28 (1): 25-30.
13. Molyneux P. The use of a stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*. 2004; 26 (2): 211-219
14. Jiménez-Escrig A, Ove L; Daneshvar B, Pulido R, Saura-Calixto F. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51 (18): 5540-5545.
15. Romero T, Pérez M, Ortola D. Efecto del tratamiento higienizante, recubrimiento comestible y envasado en atmósferas modificadas, en el control del pardeamiento enzimático en alcachofa (*Cynara scolymus* L) cortada en fresco [tesis magistral]. Valencia: Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Universidad Politécnica de Valencia.

VALOR NUTRICIONAL DE LA LARVA DE *Rhynchophorus palmarum* L.: COMIDA TRADICIONAL EN LA AMAZONÍA PERUANA

Gabriel E. Vargas^{a*}, Giovana Espinoza^b, Candy Ruiz^b, Rosario Rojas^b

RESUMEN

La larva de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleóptera: Curculionidae) es conocida como “suri” en la Amazonía peruana. Esta larva ya sea cruda o frita en su propio aceite, es un alimento importante para varios grupos nativos amazónicos. Las larvas son muy apreciadas por su sabor y se pueden encontrar en varios mercados locales. A pesar de su relevancia en la alimentación humana, se sabe poco sobre la composición proximal de las larvas de *R. palmarum* que se consume en la Amazonía peruana. En el presente artículo reportamos el perfil de ácidos grasos de los aceites obtenidos por separado de la piel y del contenido graso digestivo, así como el análisis proximal de la piel y el perfil de aminoácidos de la proteína de la larva. El alto contenido de proteína en la piel (45,82% peso seco), el aceite en el contenido graso digestivo y la composición de aminoácidos de la proteína nos indica, que el suri es una buena fuente de nutrientes, aprovechable bajo un consumo responsable.

Palabras clave: Valor nutricional, *Rhynchophorus palmarum*, Amazonía peruana, suri.

NUTRITIONAL VALUE OF *Rhynchophorus palmarum* L. LARVAE: A TRADITIONAL FOOD FROM THE PERUVIAN AMAZON

ABSTRACT

The larvae of the palm beetle *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) is known as “suri” in the Peruvian Amazon. The larvae, either raw or fried in its own oil, are an important food source for several groups of Amazon natives. The larvae are very appreciated by its taste and can be found in several local markets. On spite of its relevance on human food, little is known on the proximate composition of the palm beetle larvae consumed in Amazonian Peru. In the present article, we report the fatty acids profile from the oils separately obtained from the skin and digestive fat of the larvae as well as the proximate analysis of the skin and aminoacid profile of the insect protein. The high total protein content of the skin (45.82% on a dry weight basis), the oil content in the digestive fat and the aminoacid composition of the protein suggest that suri is a good source of nutrients, low usable responsible consumption.

Key words: Nutritional value, *Rhynchophorus palmarum*, Peruvian Amazon, suri.

INTRODUCCIÓN

En muchas culturas occidentales, los artrópodos, incluyendo insectos y otros invertebrados terrestres, se han degustado como plato principal y/o un manjar. Más de 1000 especies de insectos son consumidos por los seres humanos en países tropicales, con un promedio de 20 a 30 especies que forman parte de la gastronomía de cada región¹.

^a Centro de Investigación, Universidad Científica del Perú, Av. José A. Quiñones km 2,5, Iquitos, Perú. e-mail: gvargas@ucp.edu.pe

^b Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Investigaciones demostraron que algunos de los insectos considerados como plagas, tienen una alta calidad nutricional. Estos insectos proporcionan una alta calidad de proteínas y suplementos (minerales y vitaminas), en algunos casos son criados y vendidos a la población que lo consideran como una delicia².

El consumo de invertebrados puede proporcionar significantes cantidades de proteína animal, especialmente a las comunidades indígenas durante los periodos más difíciles del año, tales como en la temporada de lluvias donde los peces y la caza son escasos³.

Dentro de todas estas especies, uno de los más usados como comida tradicional en estos países tropicales es la larva de *Rhynchophorus palmarum*, un coleóptero de la familia Curculionidae. Generalmente esta larva es muy buscada por la gente, porque tiene un alto valor nutritivo y muchos nativos amazónicos utilizan el aceite que se extrae de ésta para el tratamiento de enfermedades respiratorias⁴. La composición nutricional de la larva de *R. palmarum*, usada como un alimento por los indígenas amazónicos y los sustratos de su palmera ha sido ampliamente investigado por Cerda⁵, donde indica que tiene un alto valor nutricional y es rica en vitaminas E y A, siendo un invaluable recurso local para las poblaciones indígenas.

En la Amazonía peruana, se conoce como suri a la larva de varias especies de papazos o escarabajos que se desarrollan en el tronco (estípote) caído de diferentes palmeras. En el tronco del aguaje *Mauritia flexuosa* L.f. se desarrollan por lo menos 4 especies diferentes de suris: *Dynamis borassi*, *D. nitidulus*, *Rhinostomus barbirostris* y principalmente *R. palmarum*. En los pueblos amazónicos, se consumen en gran cantidad las larvas de *R. palmarum* procedentes de la palmera "aguaje" *M. flexuosa*⁶. Las personas colectan las larvas de los troncos caídos del aguaje y los comen directamente o los llevan a sus casas para comerlos asados⁵.

Las larvas de *R. palmarum* se comercializan en los mercados y centros turísticos de la ciudad de Iquitos en formas diferentes: vivo, cocido y asado, en un promedio de 3500 unidades por día, siendo los días sábados y domingos los de mayor venta. Como fuente de proteína, la larva de *R. palmarum* es, en la Amazonía peruana, un producto muy valorado; su demanda es fuerte y además, es un alimento muy apreciado por su exquisito sabor⁷.

En el presente artículo reportamos el perfil de ácidos grasos de los aceites obtenidos por separado de la piel y del contenido graso digestivo, así como el análisis proximal de la piel y el perfil de aminoácidos de la proteína de la larva de *R. palmarum*.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó un análisis del contenido de ácidos grasos del aceite de la piel y del CGD, obtenido para ambos de diferentes maneras, además del análisis nutricional de la piel.

Material biológico

Las larvas adultas de *R. palmarum* fueron adquiridas en el mercado de Belén de la ciudad de Iquitos, Loreto, Perú (Latitud S 34610.1 y Longitud W 731658.7). Se transportaron hasta el laboratorio en un envase con la debida oxigenación y con la fibra de la palmera aguaje *Mauritia flexuosa* L.f como alimento.

Obtención de la piel y el contenido de grasa digestiva (CGD)

Las cabezas de las larvas fueron cortadas, luego se seccionó transversalmente el abdomen y con una espátula se procedió a separar el contenido de grasa digestiva (CGD), de la piel.

Extracción de los aceites

La piel de la larva fue secado a 70 °C durante 4 días, luego se trituroó en un matraz. Seguidamente a 16 g de piel se secó, trituroó y colocó en un extractor Soxhlet durante 3 horas y utilizando éter de petróleo como solvente, se obtiene el aceite de la piel.

El aceite del contenido graso digestivo (CGD) fue obtenido a partir de 24 g de CGD, mediante

calentamiento por un tiempo de 10 minutos. El lípido extraído se obtuvo por filtración en caliente del extracto.

Análisis fisicoquímico del aceite extraído del suri

Los pesos de los aceites extraídos de 16 g de piel seca y triturada y 24 g de CGD de *R. palmarum* se determinaron para establecer el contenido de lípidos. El resultado se expresó como el porcentaje de lípido en la materia seca de la piel o en la materia húmeda de CGD.

La composición de los ácidos grasos se analizó por cromatografía líquida-gaseosa, después de derivarlos a metil ésteres con una solución 2M de KOH en metanol a temperatura ambiente, siguiendo el método estándar IUPAC. Los análisis de los metil ésteres fueron llevados a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 7890A acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5975 Inert XL MSD With Triple-Axis Detector. Los resultados se expresaron como un porcentaje de ácido graso individual en la fracción lípida.

Análisis proximal y perfil de aminoácidos de la piel del suri

El análisis proximal se realizó de acuerdo al método recomendado por la Asociación Americana de Química Analítica (AOAC). Se determinó la humedad, grasas totales, proteínas (Kjeldahl), fibra y cenizas.

La determinación de aminoácidos se realizó en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC), marca Elite Lachron con un detector de arreglo de diodos y una columna Superspher; como eluyente se usó una solución acuosa de fosfato monobásico de potasio 2,5 mM y una mezcla de acetonitrilo:metanol (7:3). Para el tratamiento de la muestra se pesó 42 mg de la piel del suri previamente seca y desengrasada; se adicionó 20 ml de HCl 6N y 37,5 μ l de 2-mercaptoetanol. Se burbujeó la mezcla con gas nitrógeno y se calentó a 110 °C por 24 h. Se concentró la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en un matraz aforado de 10 ml con una solución de bicarbonato 50 mM. Se tomó 160 μ l de muestra y se derivatizó con dabsilo 1,24 mM, se calienta a 70 °C por 10 min, luego se agrega una solución buffer de fosfato: etanol (1:1); a continuación se inyectó 10 μ l de la muestra derivatizada en el HPLC. La identificación y cuantificación de los aminoácidos se realizó por comparación con los tiempos de retención del estándar Sigma-Aldrich®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de lípidos

Los valores de lípidos obtenidos para la piel fue de 22,11 \pm 0,89 (% peso seco), siendo esto la mitad con respecto a lo que se obtuvo para el contenido graso digestivo con 44,30 \pm 0,87 (% peso húmedo). La variación en el rendimiento de los aceites, puede ser debido a la diferencia en las partes de la larva de la cual se obtuvo el aceite, el método de extracción utilizado, así como el metabolismo nutricional de la larva. El valor de los lípidos de la piel (22,11%) fue muy parecido a valores reportados para contenido de lípidos totales de *Anticarsia gemmatalis*; más conocido como oruga de las leguminosas, donde obtienen un valor de 25,3% para la larva y 21,2% para el adulto, utilizando una dieta artificial en su alimentación⁸, pero a la vez también es mayor que a los obtenidos por Raksakantong⁹ para el escarabajo de junio (*Holotrichia sp*) con un 5,41% y el escarabajo pelotero con un 13,61% (*Copris nevinsoni* Waterhouse). Además, el valor de lípidos para CGD (44,30% en base al peso húmedo) fue mayor que el reportado por Ekpo y Onigbinde¹⁰ para la obtención de aceite de larvas de *R. phoenicis* (25,30%). Podemos decir que el alto contenido de grasa en larvas de *R. palmarum* contribuye a darle el sabor agradable cuando se fríen o se asan a la parrilla. Estos altos porcentajes de aceites encontrados en las diferentes partes de la larva de *R. palmarum*, hacen que este insecto, en su totalidad, posea un potencial aprovechable para la industria de los aceites.

Composición de ácidos grasos

La determinación de la composición de los ácidos grasos de los aceites extraídos de la piel y del CGD de la larva de *Rhynchophorus palmarum*, se expresan en la tabla 1. Los ácidos grasos más abundantes en la piel y el CGD fueron el oleico, palmítico y esteárico, seguido por los ácidos grasos mirístico, linoleico, linolénico y palmitoleico. Estos mismos ácidos grasos también han sido reportados en estudios realizados al aceite obtenido del mesocarpio del fruto de la palmera aguaje *Mauritia flexuosa* L.f.¹¹, palmera de la cual los pobladores de la Amazonía peruana recolectan las larvas de *R. palmarum*⁶.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) del aceite de la piel y del contenido graso digestivo de la larva de *R. palmarum* L.

Ácido graso	% Composición	
	Piel	CGD
Mirístico (C14:0)	1,91	2,27
Palmítico (C16:0)	41,78	43,65
Palmitoleico (C16:1)	0,75	1,01
Esteárico (C18:0)	9,41	8,52
Oleico (C18:1)	43,10	41,57
Linoleico (C18:2)	2,00	1,93
Linolénico (C18:2)	1,05	1,05

En este estudio el porcentaje de los ácidos grasos saturados fueron mayores que los insaturados representando el 53,1 y 54,44% del total de ácidos grasos correspondientes para los aceites de la piel y CGD, respectivamente (tabla 2). Estos porcentajes de ácidos grasos saturados (TAGS) fueron mayores a los reportados anteriormente por otros investigadores^{12,13} para larvas de *Rhynchophorus*, esto debido al alto porcentaje que muestra el ácido esteárico en ambos casos (piel y CGD) para nuestra investigación. Del mismo modo el porcentaje de ácidos grasos insaturados (TAGI) encontrados, son muy parecidos a los valores encontrados en el aceite de la termita *M. bellicosus*¹⁴, y también en el aceite de palma, que es el aceite de uso común en los hogares de los comunidades o pueblos amazónicos; la presencia de los ácidos grasos esenciales para el organismo, tales como el oleico, linoleico y linolénico en cantidades significativas, aumenta el valor nutritivo de estos aceites, además que se podrían utilizar como fuente de producción de ácido palmítico, que es un excelente alimento energético e industrialmente se utiliza para la fabricación de margarinas y jabones.

Tabla 2. Grado de saturación de los aceites de la piel y del contenido graso digestivo de la larva de *Rhynchophorus palmarum* L., expresado en forma de porcentajes.

	Piel	CGD
TAGI	46,90	45,56
TAGS	53,10	54,44
AGMI	43,85	42,58
AGPI	2,05	2,98

TAGI = Total de ácidos grasos insaturados;
 TAGS = Total de ácidos grasos saturados;
 AGMI = Ácidos grasos mono insaturados;
 AGPI = Ácidos grasos poliinsaturados.

Composición proximal de la piel de *Rhynchophorus palmarum*

Los resultados de la composición proximal de la piel de la larva de *R. palmarum* se muestran en la tabla 3. El contenido de agua en la piel es alto (71,50%), parecidos a valores reportados para larvas enteras de *R. palmarum*⁵ y *R. phoenicis*¹⁵, mientras que el valor de los lípidos de 6,31% (peso húmedo) se incrementa a 22,15% en peso seco; este valor es menor al reportado por Due¹², donde obtiene un 35,16% para el aceite de la piel en peso seco. El contenido proteico de la piel del suri (13,06% en peso húmedo) es muy superior, comparando con lo encontrado por Sánchez¹⁶ y Cerda⁵ para la larva entera de *R. palmarum*, 7,3% y 7,25% (en peso húmedo), respectivamente.

Esto nos muestra la importancia de la piel de la larva como una buena fuente de proteínas en la Amazonía peruana. La desnutrición en los países en vías de desarrollo es tanto o más, un problema de déficit calórico, como la deficiencia de proteínas. Este alto contenido de proteína en la piel de la larva de *R. palmarum*, nos indica del potencial que se puede aprovechar para promover su consumo sostenible y pueda ayudar a los problemas de malnutrición en los pueblos de la Amazonía.

Tabla 3. Composición proximal de la piel de la larva de *Rhynchophorus palmarum* L.

Parámetros	Peso húmedo (%)	Peso seco (%)
Humedad	71,50	-----
Proteínas(Nx6.25)	13,06	45,82
Grasas totales	6,31	22,15
Cenizas	1,38	4,83
Carbohidratos	7,81	2,2

Perfil de aminoácidos de la piel de *Rhynchophorus palmarum*

La calidad de proteína en los alimentos está determinada por su contenido de los aminoácidos esenciales. El perfil de aminoácidos y la puntuación química de la piel de la larva de *R. palmarum* se muestra en las tablas 4 y 5, respectivamente. Este es rico en aminoácidos esenciales, especialmente en valina e isoleucina, y podría cumplir el requerimiento mínimo requerido para aminoácidos esenciales¹⁷, a excepción de la metionina e histidina, que tienen valores bajos, 38,56 y 2,82%, respectivamente.

En nuestra investigación es de especial interés el valioso nivel de leucina, lisina y treonina que normalmente se encuentran en las larvas de insectos¹³. La lisina y treonina son los aminoácidos limitantes en dietas a base de trigo, arroz, yuca y maíz, frecuentes en países en vías de desarrollo¹⁸, mientras que la leucina e histidina, tienen mucha influencia para el crecimiento de niños pequeños¹⁹. Los valores de los aminoácidos azufrados no son muy altos, pero sin embargo pueden cumplir con las cantidades diarias recomendadas (RDA) para estos aminoácidos. Comparando la composición de aminoácidos en la piel de la larva de *R. palmarum* con los alimentos de consumo habitual (cereales, verduras, carnes, etc.), nos indica que el suministro de algunos de estos aminoácidos esenciales en larvas, es superior a los que se encuentran en estos alimentos habituales²⁰.

Tabla 4. Perfil de aminoácidos de la piel de la larva de *Rhynchophorus palmarum* L.

Aminoácidos	g/100g de proteína
Aspártico	1,72
Glutámico	4,11
Asparagina	0,57
Serina	14,49
Treonina*	1,52
Glicina	1,95
Alanina	2,90
Arginina	2,73
Prolina	9,18
Valina*	1,80
Metionina*	0,59
Isoleucina*	3,88
Leucina*	3,60
Fenilalanina*	1,65
Lisina*	3,69
Histidina*	0,05
Tirosina	0,73
Glutamina	0,12

* Aminoácidos esenciales

Tabla 5. Comparación de la proteína de piel de la larva de *Rhynchophorus palmarum* L. con la cantidad de aminoácidos requeridos para un adulto.

Aminoácido	Cantidad requerida (g/100g) de proteína	Puntuación química (%)
Treonina	3,47	45,24
Valina	4,81	190,85
Metionina	1,53	38,56
Isoleucina	4,19	92,60
Leucina	7,03	51,21
Fenilalanina	3,01	54,82
Lisina	5,17	71,37
Histidina	1,77	2,82

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demuestra que la larva de *Rhynchophorus palmarum* L. que se consume en la Amazonía peruana tiene un alto valor nutricional, es rica en aceites y la piel presenta un buen contenido proteico. Este hecho nos sugiere que tanto la larva entera como su piel por separado, pueden ser aprovechadas como una buena fuente de nutrientes mediante un consumo sostenible.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Unidad de Investigación de Productos Naturales de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su apoyo logístico a la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marconi S, Manzi P, Pizzoferrato L, Buscardo E, Cerda H, Lopes D. *et al. Biotropica* 2002; 34 (2): 273-280.
2. Banjo AD, Lawal OA, Songonuca EA. *Afr J Biotechnol* 2006; 5 (3): 298-301.
3. Paoletti MG, Dufour DL, Cerda H, Torres F, Pizoferrato L, Pimentel D. *Proc R Soc Lond B* 2000; 267: 2247-2252.
4. Bourdy G, DeWalt SJ, Chávez de Michel LR, Roca A, Deharo E, Muñoz V. *et al. J Ethnopharmacol* 2000; 70: 87-109.
5. Cerda H, Martínez R, Briceño N, Pizzoferrato L, Hermoso D, Paoletti M. *Ecotrópicos* 1999; 12 (1): 25-32.
6. Del Castillo D, Otárola E, Freitas L. “Aguaje, la maravillosa palmera de la Amazonía”, Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú, 2006.
7. Delgado D, Couturier G, Mathews P, Mejía K. *Bol SEA* 2008; 41: 407-412
8. Cookman JE, Angelo MJ, Slanky F, Nation JL. *J Insect Physiol* 1984; 30 (7): 523-527.
9. Raksakantong P, Meeso N, Kubola J, Siriamornpun S. *Food Res Int* 2010; 43 (1): 350-355
10. Ekpo KE, Onigbinde AO. *Nig Annals Natur Sci* 2004; 5: 28-36.
11. Vásquez-Ocmín P, Freitas L, Sotero V, Paván R, Mancini-Filho J. *Grasas y Aceites* 2010; 61 (4): 390-397.
12. Due EA, Zabri HC, Kouadio JP, Kouamé LP. *Afr J Biochem Res* 2009; 3 (4): 89-94.
13. Ekpo KE, Onigbinde AO. *Pak J Nutr* 2005; 4 (5): 287-290.
14. Eko KE, Onigbinde AO. *Pak J Nutr* 2007; 6 (3): 247-251.
15. Edijala JK, Egbogbo O, Anigboro AA. *Afr J Biotechnol* 2009; 8 (10): 2346-2348.
16. Sánchez PA, Jaffé K, Hevia P. *Bol Entomol Venez* 1997; 12 (1): 125-127.
17. Okaraonye C, Ikewuchi J. *J Biol Sci* 2008; 8 (7): 1221-1225.
18. Ozimet L, Sauer W, Kozikowski V, Ryan J, Jorgensen H, Jelen P. *J Food Sci* 1985; 50: 1327-1332.
19. Latham MC. “Nutrición Humana en el Mundo en Desarrollo”, Fao, Roma, 2002.
20. Suárez M, Kislansky A, López L. *Nutr Hosp* 2006; 21 (1): 47-51.

POLIMERIZACIÓN DE COMPUESTOS ANTOCIÁNICOS PRESENTES EN EL COLORANTE DE LA HIERBA SANTA (*Cestrum hediondinum* D.) Y PRUEBA DE ADSORCIÓN DE IONES ALUMINIO (III)

Rossana Georgina Juárez Montiel^{*}, Nilda Pinto Apaza¹,
Teresa Cano de Terrones¹

RESUMEN

Del colorante de la “hierba santa” *Cestrum hediondinum* D., se separó seis fracciones. El sólido de la fracción C presenta λ_{\max} 546 nm (BI), 282 nm (BII) y un hombro a 328 nm. El precipitado de la fracción A, λ_{\max} 520 nm (BI), 280 nm (BII); ambos polimerizan con formaldehído en medio ácido oxálico a un pH entre 3,0 a 4,0. Esto es confirmado por el estudio espectroscópico IR de los sólidos obtenidos, los que muestran la aparición de bandas 1452 cm^{-1} y 778 cm^{-1} , correspondientes al grupo metileno. El estudio espectroscópico IR del sólido polimérico de la fracción C con tricloruro de aluminio nos muestra bandas fuera del intervalo normal 2993 cm^{-1} y $2465,72\text{ cm}^{-1}$ y la variación en las señales 1312 cm^{-1} y 1073 cm^{-1} , todas relacionadas a los enlaces C-O y O-H fenólicos. El estudio SEM del sólido polimérico de la fracción C con aluminio (III) no muestra una adsorción uniforme.

Palabras clave: *Cestrum hediondinum* D., antocianina, polifenoles, polimerización

POLYMERIZATION OF ANTHOCYANIN COMPOUNDS PRESENT IN THE COLORING OF THE YERBA SANTA (*Cestrum hediondinum* D.) AND PROOF OF ION ADSORPTION ALUMINUM (III)

ABSTRAC

Of the coloring of the “hierba santa” *Cestrum hediondinum* D., they separated six fractions. The solid of the fraction C λ_{\max} 546 nm (BI), 282 nm (BII) and a shoulder to 328 nm. The precipitate of the fraction A, λ_{\max} 520 nm (BI), 280 nm (BII); polymerised with formaldehyde in oxalic acid at a pH between 3,0 to 4,0. Is This confirmed by the IR spectroscopic study of the obtained solids those that show the appearance of bands 1452 cm^{-1} and 778 cm^{-1} , corresponding to the methylene group, which would confirm the polymerization. The IR spectral studies of solid polymer of the fraction C with aluminum trichloride shows us bands outside of the normal interval 2993 cm^{-1} and $2465,72\text{ cm}^{-1}$ and the variation in the signs 1312 cm^{-1} and 1073 cm^{-1} all related to the connection C-O and O-H phenols. The study SEM of the solid polymer of the fraction C with aluminum (III), not being uniform the adsorption.

Keywords: *Cestrum hediondinum* D., polyphenol, anthocyanin, polymerization.

¹ Facultad de Ciencias Naturales y Formales, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Santa Catalina 117

^{*} juarezroxanag@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La hierba santa, cuyo nombre científico es *Cestrum hediondinum* D., es una planta silvestre que en Arequipa la encontramos en los distritos de Sabandía, Characato, Chiguata, Mollebaya y a lo largo de las riveras del río Chili; es un arbusto muy ramificado, de olor desagradable, de hojas elípticas lanceoladas, flores tubulosas de color verdusco-amarillento. El fruto es una baya ovoide, violácea-negrusca, dispuesta en racimos, que presenta un colorante que es la mezcla de cinco compuestos antociánicos al estado de glicósidos.¹

Debido a su estructura, los compuestos antociánicos pueden ser usados como ligandos en la coordinación de iones metálicos, por lo que la diversidad de colores en las flores es explicada por la formación de quelatos entre el metal y la sal flavilio de color rojo de la antocianina. Los metales más comunes en complejos con antocianinas reportados son: Sn, Cu, Fe, Al, Mg, y K². Asimismo, se ha demostrado que en el vino, tanto los antocianos como los taninos pueden unirse por medio de una reacción en la que interviene el acetaldehído. Esto da lugar a productos enlazados por puentes de etilo (T-etil-T), aductos de tanino-antocianos (T-etil-A) y antocianos entre sí (A-etil-A).³

Tomando en consideración lo anterior se planteó el objetivo de polimerizar los compuestos antociánicos presentes en el colorante de la hierba santa (*Cestrum hediondinum*, D.) y probar su aplicación en la adsorción de iones aluminio.

PARTE EXPERIMENTAL

La materia prima fue los frutos maduros de la especie vegetal *Cestrum hediondinum*, D. “hierba santa”. La muestra fue recolectada entre las siete y diez horas en el distrito de Characato – Arequipa, en latitud (°) -16,40; longitud (°) -71,52 y elevación (msnm) 2413, siendo la temperatura promedio de 20 °C.

Extracción de antocianinas por maceración simple en refrigeración a 4 °C

Se pesó 100 gramos de hollejo estabilizado seco y pulverizado y se extrajo con 1000 mL de solvente etanol:agua 70:30, por 48 horas. Terminado el tiempo de maceración, se decantó y se realizó la filtración al vacío utilizando para los lavados porciones etanol-agua. El filtrado fue concentrado a una temperatura no mayor a 30 °C para evitar la degradación.⁴

Separación por cromatografía en columna de los compuesto antociánicos

20 mL de la solución concentrada del filtrado se mezclaron 20 g de sílicagel 60 (0,063-0,200 mm). La mezcla fue secada a temperatura ambiente, pulverizada en un mortero de porcelana y colocada en una columna cromatográfica; previamente es empacada con sílicagel y saturada con el propan-2-ol. Se eluyó con propan-2-ol, etanol absoluto, etanol al 98% y agua destilada y se colectó diferentes fracciones.

Caracterización por espectroscopía UV-VIS de antocianinas; barrido espectral de 200-800 nm

Se pesó 0,01 g de muestra proveniente de las fracciones colectadas y se disolvió en 10 mL de metanol espectroscópico Uvasol® (Merck), adicionando 3 gotas de solución acuosa de HCl al 50%, y se realizó el barrido espectral de 200 a 800 nm, previa calibración con el blanco.

Espectroscopía UV-Vis con el empleo de reactivos diagnósticos

Se empleó metóxido de sodio, tricloruro de aluminio, tricloruro de aluminio/ácido clorhídrico y acetato de sodio, tal como lo indica la literatura.⁵

Caracterización por espectroscopía de infrarrojo (IR) de las antocianinas

Los espectros fueron registrados en espectrofotómetros con transformada de Fourier Perkin-Elmer a partir de muestras sólidas (Universidad Nacional Mayor de San Marcos).

Síntesis de polímeros

Se mezcló 20 g de antocianina, 3,5 g de una solución acuosa de formaldehído al 37% de pureza y 50 mL de metanol; la mezcla se calienta a reflujo en un baño maría con movimiento hasta la formación de una solución homogénea; luego se añade 1 g de ácido oxálico y se calienta por 1 hora; se añade metanol (50 mL) y se prosigue con el calentamiento 1 hora más. Luego se filtra y lava el precipitado con etanol.

Caracterización del polímero

Se determinó los grupos funcionales por espectroscopía IR y la solubilidad por la variación del índice de refracción del solvente.

Se colocó 0,01 g del polímero en un tubo de ensayo provisto de tapa al que se añade 2,0 mL de disolvente. Se agita continuamente y se mide el índice de refracción del líquido; se utilizó un refractómetro Abbé.⁶

Caracterización estructural del polímero: Microscopía electrónica de barrido

La muestra fue metalizada con oro. La observación punto por punto fue realizada con un microscopio electrónico de barrido, el SEM XL20 de PHILIPS, equipado con detector de electrones retrodispersados y microanalizador de difracción de rayos X por energía dispersiva EDAX DX-4i del Centro de Microscopía electrónica de la UNSA.

Pruebas de adsorción de iones metálicos aluminio (III) por interacción sólido-líquido

Se colocó en contacto 10 mL de una disolución metanólica de $AlCl_3$ 0,2 M preparada a partir de tricloruro de aluminio anhidro, con 0,1 g de polímero a temperatura ambiente durante 24 horas con agitación constante; luego el polímero es filtrado, lavado con metanol y secado, para su análisis por espectroscopía IR y SEM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación por cromatografía en columna de los compuestos antociánicos

Se obtuvo seis fracciones codificadas como A, B, C, D, E, F. La fracción D eluída con etanol de 98° muestra la mayor concentración de compuestos antociánicos. Siendo la fracción A y D inestables y la F insoluble en metanol.

A continuación se verán los resultados correspondientes a la fracción C y al precipitado de la fracción A.

Caracterización espectroscópica UV-Vis de antocianinas

Los resultados experimentales para la fracción C se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados UV-Vis de la fracción C

Reactivo	λ máxima absorbancia (nm)			Tipo de desplazamiento		
	Banda I	Banda II	Acilación	Banda I	Banda II	Acilación
HCl	546	282	328	patrón	patrón	patrón
$AlCl_3$	590	280	326	*	ninguno	ninguno
$AlCl_3/HCl$	549	280	328	ninguno	ninguno	ninguno
NaOMe	620	degradación	384	*	sin señal	*
NaOAc	618	degradación	378	*	sin señal	*

*Batocrómico

El espectro UV-Vis obtenido en un espectrofotómetro UV-Vis 8452 A Hewlett Packard corresponde a un compuesto antocianínico por las características de las bandas I y II, posiblemente derivado de la delfinidina ($\lambda_{\text{máx.}}$ 546 nm, 282 nm), presentando una señal adicional correspondiente a un compuesto acilado, que por el valor sería del ácido cafeico⁴, el cual estaría anulando el efecto del azúcar. Los resultados con los reactivos diagnóstico, evidencian grupos OH en posición orto y sensibles a la ionización, con grupos OH libres en el anillo A, posiciones C5 y C7.

En la tabla 2 se presentan los resultados experimentales para el precipitado de la fracción A.

Tabla 2. Resultados UV-Vis del precipitado de la fracción A

Reactivo	λ máxima absorbancia (nm)			Tipo de desplazamiento		
	Banda I	Banda II	Acilación	Banda I	Banda II	Acilación
HCl	520	280	Sin señal	ninguno	ninguno	Sin señal
AlCl ₃	582	274	358	*	ninguno	nueva señal
AlCl ₃ /HCl	526	280	370	ninguno	ninguno	*
NaOMe	596	262	346	*	**	*
NaOAc	552	270	Sin señal	*	**	Sin señal

*Batocrómico; ** hipsocrómico

Igualmente, se deduce que la antocianina presenta grupos *o*-hidroxilo en el anillo B, sensibles a la ionización con metóxido de sodio; los grupos OH del anillo A muestran una variación hipsocrómica con metóxido de sodio y acetato de sodio en la señal así como una disminución en la absorbancia.

Elección de las antocianinas monoméricas

El monómero antocianínico para el proceso de polimerización debe cumplir con el requisito estructural de presentar un OH en C7, y *o*-hidroxilos para la coordinación con el ion Al (III).

Tabla 3. Presencia de grupo OH de las antocianinas en las diferentes fracciones

Condiciones estructurales	Fracción					Precipitado de la fracción A
	A	B	C	D	E	
<i>o</i> -OH anillo B	+	+	+	+	-	+
5-OH anillo A	-	-	+	+	+	No es marcada la señal
7-OH anillo A	inestable	-	+	-	-	No es marcada la señal

De acuerdo a los resultados, (tabla 3), podemos concluir que para el proceso de polimerización se elige la fracción C etanólica por tener grupos OH en posición orto y los grupos OH de las posiciones C5 y C7 libres y el precipitado de la fracción A propan-2-ol por tener grupos OH en posición orto e indicios de OH libre en la posición C5 y C7.

Caracterización por espectroscopía de infrarrojo (IR) de las antocianinas

Antocianina de la fracción C

El espectro IR corresponde a un compuesto aromático con grupos hidroxilos. No ha presentado bandas para grupos metóxilos (2850cm^{-1} , 2815cm^{-1} , 1237cm^{-1} y 1272cm^{-1}).

Antocianina precipitada de la fracción A

El espectro IR corresponde a un compuesto aromático con grupos hidroxilos. No ha presentado bandas para grupos metóxilos (2850cm^{-1} , 2815cm^{-1} , 1237cm^{-1} y 1272cm^{-1}).

Síntesis de polímeros

La técnica de polimerización empleada cumple con las siguientes condiciones de reacción:

Estructurales: De acuerdo a los resultados espectroscópicos UV-Vis e IR, estamos frente a núcleos derivados de la delfinidina (fracción C) y cianidina (precipitado de la fracción A), compuestos polifenólicos con el grupo OH libre en C7, necesario para el ataque electrofílico en posiciones C6 y C8.

Relación molar de la antocianina y el formaldehído: La relación molar para la obtención de un polímero lineal está en función de los grupos activos en los monómeros. En el caso del fenol, es trifuncional (dos posiciones orto y una para); la molécula de metanal es bifuncional, por lo que la relación molar fenol – metanal es de 1: 0,75-0,80. En el caso de la antocianina se estaría comportando como una molécula bifuncional con sólo dos posiciones para reaccionar C6 y C8, por lo que se optó por una relación molar 1:1; se tomó como peso molecular referencial para la antocianina el de la delfinidina-3-O-glucósido (465 g/mol).

Medio de la reacción: El metanol estabiliza al ion hidroximetilcarbonylo por su naturaleza nucleofílica. En general, los reactivos polares favorecen los mecanismos de reacción iónicos.

pH: En este tipo de reacción donde las antocianinas son los monómeros, es importante el pH, el que debe ser ácido para evitar la degradación de la antocianina por apertura del anillo C hacia la formación de chalcona con pérdida irreversible de sus propiedades. Un pH de 3 a 4 en la reacción permite tener a la molécula de antocianina al estado de ion flavilio en equilibrio con la pseudobase carbinol.

El ion flavilio se comporta como un electrófilo siendo su forma pseudobase carbinol la que es más susceptible al ataque electrofílico del ion hidroximetilcarbonylo en sus posiciones nucleofílicas C6 y C8.

El pH está dentro del rango 3,5- 4,1 del vino tinto, en el que se da reacciones de condensación hacia la forma A^+ -etil-AOH.⁷

Catalizador: El catalizador elegido fue el ácido oxálico por ser un ácido débil que permite alcanzar fácilmente el pH de la reacción y mantenerlo constante durante todo el proceso de polimerización.

Temperatura: Se trabajó a una temperatura de 50 °C para evitar la degradación de los compuestos antociánicos y la ebullición del disolvente.

Caracterización fisicoquímica de los sólidos obtenidos

Análisis del espectro IR del sólido polimérico de la fracción C

De acuerdo a las señales en el espectro IR obtenido, podemos indicar que hay polimerización por la aparición de nuevas bandas en 1452cm^{-1} y 779cm^{-1} correspondientes a los grupos metileno (figura 1).

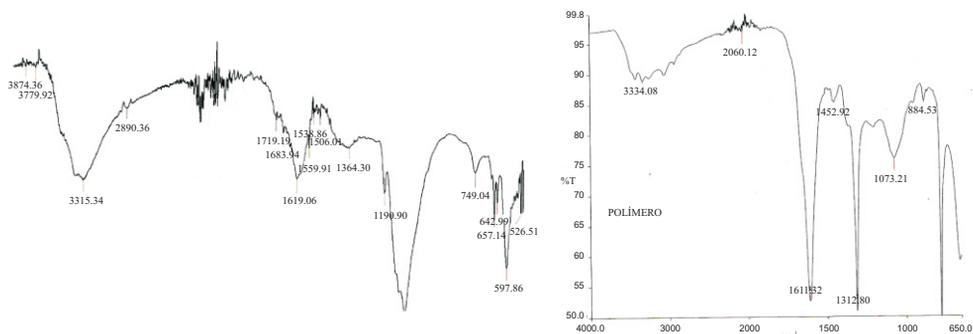


Figura 1. Espectro IR de la antocianina de la fracción C y espectro IR del sólido polimérico

Análisis del espectro IR del sólido polimérico del precipitado de la fracción A

De acuerdo a las señales en el espectro IR obtenido podemos indicar que hay polimerización por la aparición de nuevas bandas en 1460 cm^{-1} y 778 cm^{-1} correspondientes a grupos metileno en el sólido obtenido (figura 2).

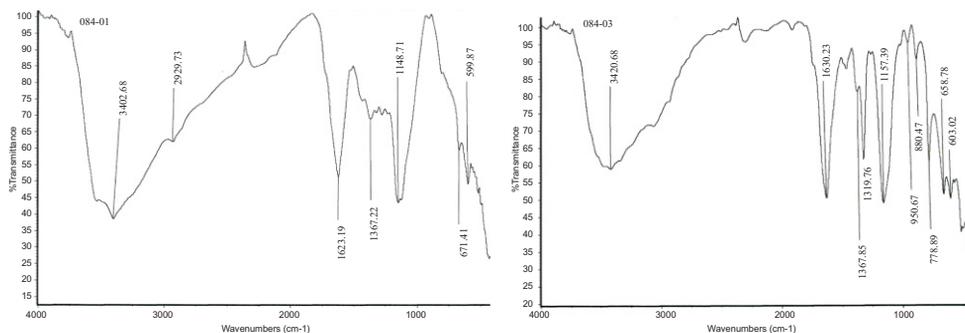


Figura 2. Espectro IR de la antocianina de la fracción A y espectro IR del sólido polimérico

Mecanismo de reacción

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos se propone un mecanismo de polimerización que implica formación de uniones metilénicas entre antocianos. Se toma en consideración al anillo A, ya que para explicar la polimerización de los antocianos únicamente los anillos A o C toman parte en las reacciones de polimerización.⁸ Las antocianinas difieren en el patrón de sustitución en el anillo B, por lo que los distintos sustituyentes de anillo B no deberían tener ningún afecto en el ratio de polimerización de unos antocianos u otros.⁹ La polimerización termina cuando la molécula en crecimiento se hace insoluble en el disolvente y precipita.

De acuerdo a los resultados experimentales podemos indicar que los polímeros obtenidos sobrepasan el grado de oligómeros, es decir, las ocho unidades residuales de antocianinas, por lo que precipitan.¹⁰

También se puede concluir que las moléculas poliméricas contienen unidades residuales de antocianinas al estado de iones flavilio evidenciado por el color púrpura de los sólidos obtenidos.¹¹

El pH de 3 a 4, en el proceso de polimerización, asegura la presencia del equilibrio entre los iones flavilio con sus pseudobases carbinol.

Solubilidad

La muestra polimérica de la fracción C etanólica fue sometida a disolventes del orden hidrofílico a lipofílico, registrándose el índice de refracción cada veinticuatro horas durante cuatro días. De los disolventes ensayados se pudo observar la variación progresiva del índice de refracción del hexano, concluyéndose que el sólido polimérico es insoluble en agua y etanol, acetato de etilo y parcialmente soluble en hexano por lo que se confirma el cambio en la estructura de la antocianina ya que la molécula monoméricas de antocianina es soluble en agua y etanol cuando están al estado de glicósidos y solubles en etanol al estado de aglicona.

Caracterización estructural SEM del polímero

Los sólidos poliméricos obtenidos a partir de antocianinas glicosídicas presentan el problema de hidratación, no pudiéndose tomar imágenes adecuadas, por lo que se optó por polimerizar la aglicona de la fracción C etanólica, registrándose las imágenes en el SEM, las cuales nos muestran un sólido poroso (figura 3).

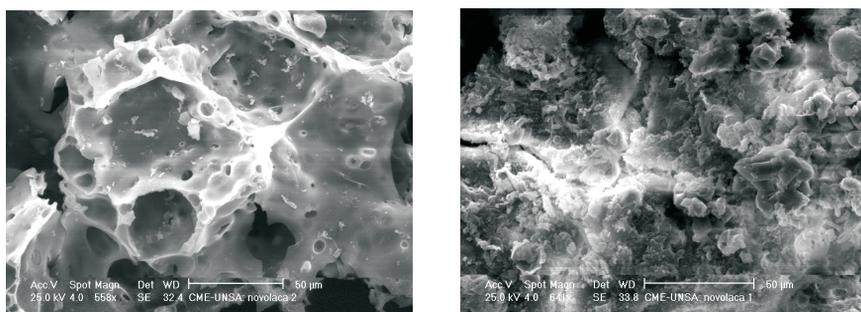


Figura 3. Imagen SEM del polímero de la aglicona de la fracción C y del polímero del precipitado de la fracción A

Pruebas de adsorción de iones aluminio (III)

Las pruebas se realizaron con el polímero obtenido a partir de la fracción C etanólica; la solución metanólica de tricloruro de aluminio estuvo en contacto con el sólido polimérico por 24 horas a temperatura ambiente; luego fue filtrado y lavado con metanol. Al secar el sólido polimérico, inicialmente de color púrpura, cambió a azul lo que ya evidencia la coordinación de los grupos *o*-hidroxilo con los iones Al^{3+} .

Espectro IR de adsorción de iones aluminio (III)

El espectro IR muestra una señal 2993 cm^{-1} que está fuera del intervalo normal, indicando un equilibrio con la formación de un quelato; la señal $2465,72\text{ cm}^{-1}$ está también fuera del intervalo normal relacionada al estiramiento del enlace O-H.

La variación en las señales 1312 cm^{-1} y 1073 cm^{-1} también están relacionadas con los enlaces O-H y C-O.

De acuerdo a las señales en el espectro obtenido podemos indicar que la interacción de las antocianinas poliméricas con los iones aluminio afecta las bandas correspondientes a los grupos –OH fenólicos.

Análisis SEM de adsorción de iones aluminio (III)

La figura 4 muestra la composición química porcentual SEM del polímero con el ion aluminio (III); se confirma la adsorción del ion Al^{3+} , y que no es uniforme en toda la muestra.

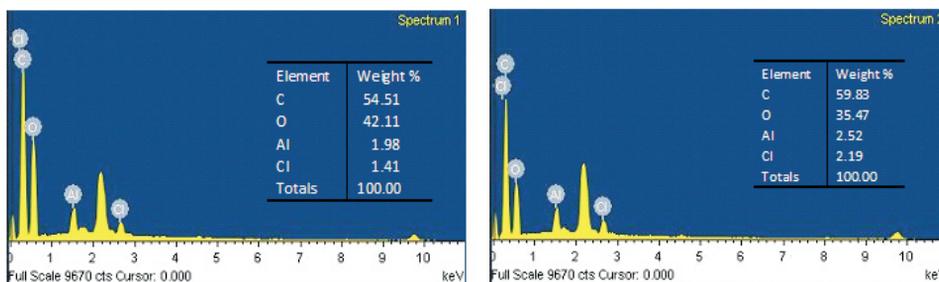


Figura 4. Análisis químico porcentual de toda el área de la imagen y porcentual puntual

CONCLUSIONES

- Del colorante de la hierba santa se separaron seis fracciones. La caracterización UV-Vis dio como resultado que las fracciones corresponden a compuestos antocianínicos y que presentan grupos *o*-dihidroxis en el anillo B, lo que permite la complejación con el ion Al^{3+} , excepto la fracción acuosa E. La caracterización IR confirma la presencia de grupos hidroxilos.
- El sólido de la fracción C de $\lambda_{\text{máx}}$. 546 nm (BI), 282 nm (BII) y un hombro a 328 nm, y el precipitado de la fracción A de $\lambda_{\text{máx}}$. 520 nm (BI), 280 nm (BII), polimerizan con formaldehído en medio ácido oxálico a un pH de 3,0 a 4,0. Esto es confirmado por el estudio espectroscópico IR de los sólidos obtenidos, los que muestran la aparición de bandas 1452 cm^{-1} y 778 cm^{-1} , correspondientes al grupo metileno, lo que confirma la polimerización.
- El sólido polimérico de la fracción C etanólica es parcialmente soluble en hexano, lo que indica una modificación estructural de la antocianina inicial soluble en agua y etanol.
- El estudio espectroscópico IR de la muestra polimérica de la fracción C que es sometida a la acción de una solución de tricloruro de aluminio, nos muestra bandas fuera del intervalo normal a 2993 cm^{-1} y $2465,72\text{ cm}^{-1}$, y la variación en las señales 1312 cm^{-1} y 1073 cm^{-1} , todas relacionadas con los enlaces C-O y O-H fenólicos.
- El estudio SEM del sólido polimérico de la fracción C con aluminio (III) no muestra una adsorción uniforme.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Unidad de Posgrado de Facultad de Ciencias Naturales y Formales, por el apoyo prestado para la realización de este trabajo de investigación.

REFERENCIAS

1. Juárez Montiel R. Extracción, Purificación e Identificación del colorante de la Hierba Santa (*Cestrum hediondinum*, D.) [Tesis de Licenciatura]. Arequipa, Perú, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 1993.
2. Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berryanthocyanins. University of Helsinki, Finlandia, 2005.
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/rein/copigmen.pdf>
3. Cheynier, V. El color de los vinos tintos. *Wine Internet Technical Journal*, 2003;4: 1-9.
4. Antocianos y Betaninas colorantes naturales de aplicación Industrial. Publicación del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) y la Comisión Nacional Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT). Red. IVD Sustancias Fitoquímicas de Aplicación Industrial Subprograma IV: Biomasa como fuente de Productos Químicos y Energía Proyecto IV.10. Santiago de Chile, 2003
5. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Lima-Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1988.
6. Armelin Elain. Síntesis y Caracterización de Nuevas Poliesteramidas: Estudio de sus Propiedades. [Tesis Doctoral]. Barcelona, España: Universidad Politécnica de Cataluña ; 2002.
7. Ribereau-Gayon P, Glories Maujean A. Dubourdieno. Tratado de Enología. Química del vino, estabilización y tratamientos. Argentina: Ediciones Mundiprensa; 2003.
8. Cheynier V. Moutounet, M. Sarni- Manchado, P. Los compuestos fenólicos. En enología: Fundamentos científicos tecnológicos. Argentina. Ediciones Mundiprensa, p. 114-136. 2000.
9. Garcia-Beneytez E, Revilla E, Cabello F, Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology*, 2002; **215**: 32-37.
10. Santos-Buelga C, Bravo-Haro S, Rivas-Gonzalo J. C. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in models solutions. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1995; **201**: 269-274.
11. Atanasova V, Fulcrand H, Le Guernevé C, Cheynier V, Moutounet M, Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters*, 2002; **43**: 6151-6153.

Enseñanza de la Química

ESPECTRÓMETRO PARA RADIACIÓN VISIBLE HECHO EN CASA, DE BAJO COSTO Y ALTAS PRESTACIONES

Eduardo Montoya Rossi^{2*}, Óscar Baltuano Elías^{1,3}, Aurelio Arbildo López⁴

RESUMEN

Un problema de la enseñanza – aprendizaje del análisis químico instrumental es el alto costo de la instrumentación comercial, incluyendo aspectos de mantenimiento y servicio. Esto limita el acceso de los estudiantes a la operación directa de los diversos instrumentos, comprometiendo la calidad de su formación profesional.

En este trabajo se describe detalladamente un espectrómetro de luz visible de 390 – 650 nanómetros, de fácil construcción, bajo costo, robusto y de altas prestaciones, adecuado para espectro-fotometría de absorción y fluorescencia moleculares y emisión atómica.

El espectrómetro no tiene partes móviles y usa como detector una cámara web conectada a una computadora personal, que permite la adquisición, presentación, procesamiento y registro de los espectros, a condiciones elegidas por el experimentador. El dispersor es la cara metálica interna de un pedazo de DVD virgen, expuesta para obtener una red de difracción de reflexión de primera superficie y la luz se transmite al dispersor mediante una fibra óptica acrílica. Los componentes del instrumento están montados rígidamente sobre una placa de aluminio ennegrecida.

Se presentan ejemplos de espectros obtenidos y mediciones de absorbancia y se discuten las ventajas y limitaciones del instrumento.

Palabras clave: Espectrofotometría, instrumentación química, análisis fotométrico, análisis químico instrumental.

LOW COST AND HIGH PERFORMANCE HOMEMADE SPECTROMETER FOR VISIBLE RADIATION

ABSTRACT

A problem of teaching and learning of instrumental chemical analysis is the high cost of commercial instrumentation, including aspects of maintenance and service. This limits the access of the students to the direct operation of the instruments, compromising the quality of their professional formation.

In this work, a homemade spectrometer for visible light of 390 – 650 nanometers is described in detail. The instrument is of easy construction, low cost, robust and of high performance,

¹ Instituto Peruano de Energía Nuclear, Dirección de Investigación y Desarrollo, División de Técnicas Analíticas Nucleares. emontoya@ipen.gob.pe

² Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias – Departamento de Química y Facultad de Educación.

³ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Física.

⁴ Universidad de Lima, Facultad de Ingeniería Industrial.

being useful for spectrometry of molecular absorption, molecular fluorescence and atomic emission.

The spectrometer has no mobile parts and uses as detector a web cam, connected to a PC, allowing the acquisition, presentation, processing and recording of the spectra, under controlled conditions chosen by the experimenter. The grating is a piece of the metallic layer of a virgin DVD, exposed in order to get a first surface reflective grating and the light is transmitted to the grating by means of a piece of an acrylic optical fiber. The components of the instrument are rigidly mounted on a darkened aluminum plate.

Examples of obtained spectra and absorbance measurements are presented and the advantages and limitations of the instrument are discussed.

Key words: Spectrophotometry, Chemical Instrumentation, Photometric Analysis, Instrumental Chemical Analysis.

INTRODUCCIÓN

Una dificultad importante en el proceso de enseñanza – aprendizaje del análisis químico instrumental es el alto costo de la instrumentación comercial disponible, que incluye aspectos de mantenimiento y eventuales reparaciones. Esta dificultad limita el acceso de los estudiantes a la operación directa de los diversos instrumentos, lo que atenta contra la calidad de la formación profesional de dichos estudiantes.

Una mejora importante en la formación académica de los estudiantes, sería que pudiesen disponer de instrumentos de bajo costo y buena calidad, que les permitan un trabajo de laboratorio individual o en grupos de no más de dos personas. Pero sería aún mejor si los estudiantes pudiesen construir sus propios instrumentos y aplicarlos obteniendo resultados cuya precisión y veracidad, demuestren experimentalmente que son adecuados para el propósito del análisis químico instrumental cualitativo y cuantitativo. Esto proporcionaría a los estudiantes una valiosa oportunidad de aprendizaje significativo, que les facilitaría la comprensión de los fenómenos y tecnología involucrados en una técnica importante de análisis químico instrumental, como es la espectro-fotometría de absorción molecular.

En el caso de los métodos ópticos de análisis químico se pueden encontrar, en la literatura, diversas propuestas para la construcción de instrumentos de bajo costo, tales como por ejemplo espectrómetros¹⁻⁵, varios de los cuales usan un CD o un DVD como red de difracción. También se han descrito fotómetros no dispersivos para mediciones de absorción⁶⁻¹⁰ y fluorescencia¹¹. En el presente trabajo, se describe detalladamente la fabricación y evaluación de un espectrómetro para la radiación electromagnética en la región visible, de fácil construcción, bajo costo y altas prestaciones, adecuado para la implementación de prácticas de laboratorio de análisis químico instrumental cuantitativo y cualitativo, en los temas de espectro-fotometría de absorción molecular, espectrometría de fluorescencia molecular, espectrometría de emisión atómica y turbidimetría, aplicable en laboratorios que disponen de bajo presupuesto.

PARTE EXPERIMENTAL

Construcción del banco óptico

El instrumento propuesto utiliza como entrada de luz, una fibra óptica acrílica de las que se usan en equipos de audio. El componente dispersor es un pedazo de un disco DVD virgen, al que se le ha retirado la cubierta plástica, para obtener una red de difracción de reflexión, de primera superficie, evitando así las interferencias debidas a reflexiones múltiples. Finalmente, el detector es una cámara Web *Logitech Quickcam Pro 9000*®, que trabaja conectada a una

computadora personal portátil con sistema operativo *Linux*®, en distribución *Ubuntu 12.04 LTS*®.

El espectrómetro descrito es robusto y no tiene partes móviles. Los tres componentes del mismo están montados rígidamente sobre una placa de aluminio de 240 x 100 x 50 mm, que constituye el banco óptico y que se ha ennegrecido con pintura negra no reflectora. Para fijar cada componente se ha empleado pequeñas láminas de metal, también ennegrecidas. El montaje de los tres componentes se muestra en la figura 1. Todo el conjunto va encerrado en una lata cuyo interior y exterior se han cubierto también con la misma pintura, como se muestra en la figura 2.



Figura 1. Placa de aluminio conteniendo los tres componentes del espectrómetro.



Figura 2. Vista exterior del espectrómetro.

Construcción del dispositivo porta-celda para espectrometría de absorción y fluorescencia moleculares, en solución

El dispositivo porta-muestras se ha construido con masilla MOLDIMIX®, empleando como molde interno una cubeta descartable, envuelta en una delgada lámina de polietileno (que no se adhiere a la masilla). Como molde externo se empleó un envase de rollo fotográfico⁸. Luego del endurecimiento de la masilla, se retiró los moldes interior y exterior y se perforó agujeros para la entrada y salida de luz. También se perforó un agujero en ángulo recto con los anteriores, para las medidas de fluorescencia y turbidez. Los detalles se muestran en la figura 3.

Software

Todo el software empleado en el presente trabajo es de licencia libre. Para enfocar y configurar la cámara web, se utilizó el software *QT v4l2* (<http://linuxtv.org/downloads/v4l-utils/>). Para la adquisición de datos, que consiste en la toma de un número dado de fotografías, en forma automática, se utilizó el software denominado *streamer* (Gerd Knorr <kraxel@bytesex.org>). El procesamiento de datos se realizó con una aplicación en forma de macro, utilizando el software *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Finalmente, para la calibración de los espectros en longitudes de onda, se empleó la hoja de cálculo de la suite *Open Office* (www.openoffice.org).



Figura 3. Ejemplos de dispositivos porta-celda.

Adquisición y procesamiento de datos

Como fuente de radiación se utilizó un diodo emisor de luz (LED) blanca, recubierto con papel celofán amarillo, para atenuar el intenso componente azul. El LED se alimentó con una fuente regulada de 5 voltios, con un potenciómetro en serie para controlar la corriente suministrada, entre 1 y 20 mA. La figura 4 es una fotografía del espectro de la luz transmitida cuando el porta-muestras tiene una cubeta descartable conteniendo agua (blanco).



Figura 4. Espectro visible un LED de luz blanca, cubierto por celofán amarillo.

En la figura 4, cada columna de píxeles contiene información cuantitativa de la intensidad de luz registrada^{1-2,10}, en función de la longitud de onda. Existen sin embargo algunos detalles que considerar:

- Aunque esté impresa en escala de grises, se trata de una fotografía a color y está constituida por tres canales Rojo (R), verde (G) y Azul (B), que para trabajo cuantitativo es conveniente considerarlas como tres fotografías independientes (ver figura 5).

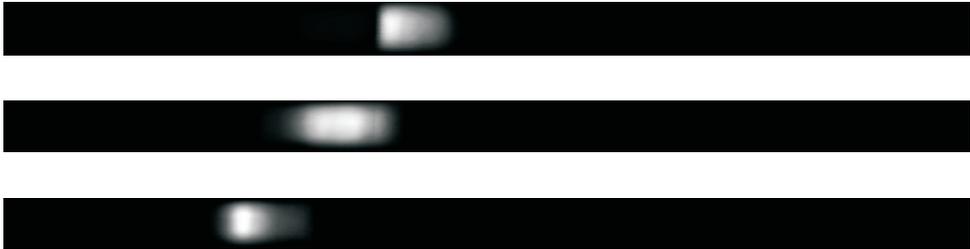


Figura 5. Canales R, G y B, correspondientes a la imagen de la figura 4.

- En el estándar RGB, la relación entre la potencia de radiación P_i , recibida por un píxel dado y el valor numérico N_i registrado (para un canal dado) no es lineal, sino que obedece a la relación: $N_i = (P_i)^{0.45}$.
- En el estándar RGB de 24 bits, los valores permitidos para N_i corresponden al intervalo $[0, 255]$, para cada canal.

Estas limitaciones de una cámara web, además de una relación señal / ruido algo desfavorable para trabajo fotométrico, nos llevaron a desarrollar el siguiente procedimiento para el procesamiento de imágenes:

1. Adquirir un conjunto de 128 fotografías para el blanco.
2. Separar cada fotografía en sus respectivos canales R, G y B.
3. Convertir cada fotografía R, G y B a formato de 32 bits.
4. Elevar todos los píxeles de cada fotografía a la potencia de $(1/0,45) = 2,2222$, como se indica en Suzuki *et al*¹⁰.
5. Para cada canal, sumar las 128 fotografías (píxel a píxel) y obtener una imagen promedio.
6. Sumar las imágenes promedio, correspondientes a los canales R, G y B, para obtener una imagen total, en escala de grises, con profundidad de 32 bits.
7. Repetir los pasos 1 a 6, para la muestra y el fondo (cubeta conteniendo el blanco y fuente de luz apagada).
8. Obtener la imagen neta del espectro del blanco, restando la imagen promedio del fondo de la imagen promedio del blanco.
9. Obtener la imagen neta del espectro de la muestra, restando la imagen promedio del fondo de la imagen promedio de la muestra.
10. Poner el valor mínimo de cada imagen neta en 1, para evitar errores de procesamiento, causados por división entre cero y por logaritmo de cero.
11. Dividir, píxel a píxel, la imagen neta del espectro del blanco entre la imagen neta del espectro de la muestra. El resultado es la imagen neta de absorción.
12. Tomar el logaritmo, base 10, de la imagen neta de absorción. El resultado es la imagen neta de absorbancia.

En el caso de espectrometrías de emisión, se siguen los pasos 1 al 9, omitiendo el paso 8 si es que no se emplea un blanco. Para obtener una curva de calibración fotométrica se sigue los mismos procedimientos, pero empleando soluciones patrón en lugar de muestras.

La calibración del espectrómetro en longitudes de onda se realizó empleando como patrón el espectro discontinuo de emisión, de una lámpara fluorescente compacta.

Reactivos

Para la obtención de espectros de absorción se usó soluciones diluidas de permanganato de potasio de diferentes concentraciones, que se obtuvieron mediante diluciones, a partir de una solución madre, de concentración arbitraria.

Para los experimentos de fluorescencia molecular se obtuvo una solución fluorescente, de concentración arbitraria, sumergiendo en agua destilada la punta de un plumón marcador amarillo¹¹. Finalmente, para la obtención del espectro de emisión atómica del sodio, se introdujo una pequeña gota de solución diluida de cloruro de sodio, en la llama de un mechero de alcohol, empleando un alambre de nicromo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 6 es una fotografía del espectro de la luz transmitida cuando el porta-muestras tiene una cubeta descartable conteniendo una solución diluida de KMnO_4 . Las fotografías mostradas en las figuras 4 y 6 son imágenes promedio, obtenidas siguiendo los pasos 1 – 7 del procedimiento indicado en la parte experimental, a las mismas condiciones de la cámara web. Por comparación con la figura 4, en la figura 6 se aprecia claramente la absorción selectiva de una porción del espectro visible, por parte del ion MnO_4^{-1} .



Figura 6. Absorción selectiva de la luz visible por el ion MnO_4^{-1} .

La figura 7 presenta el espectro de absorción, en unidades de absorbancia, correspondiente a los espectros de las figuras 4 y 6. La gráfica de del espectro se obtiene seleccionando una línea horizontal, que pasa por el centro de la imagen neta de absorbancia, obtenida en el paso 12 del procedimiento mencionado y registrando los valores de gris almacenados en cada píxel, en función del número de píxel (perfilado). En la práctica, es mejor seleccionar una banda de unos 25 píxeles de altura y registrar el valor promedio de cada columna de píxeles, en función del número de columna. El paso final es importar estos datos desde una hoja de cálculo y construir la gráfica correspondiente. Se puede graficar los valores de absorbancia en función de la longitud de onda, si se ha efectuado la calibración necesaria. En la figura 7 es importante notar que solamente una porción del gráfico, que va aproximadamente entre las columnas de píxeles 340 y 750, contiene información espectral válida. El resto corresponde a las partes oscuras de la imagen y es principalmente un artefacto producido por el ruido electrónico en los sensores de luz, de tipo CMOS, que componen el detector de imagen de la cámara web. En la porción válida de la figura 7, es evidente que el espectro obtenido es de buena calidad y los detalles observados corresponden a una resolución del orden de 2 nanómetros.

La figura 8 presenta el espectro de emisión de una lámpara fluorescente compacta, con el cual se ha realizado la calibración en longitudes de onda.

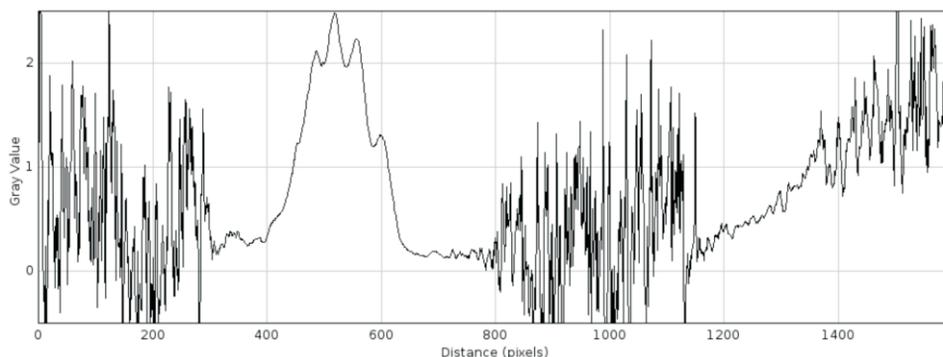


Figura 7. Espectro de absorción obtenido para una solución diluida de KMnO_4 .

La figura 9 muestra una gráfica del espectro y la figura 10 muestra la curva de calibración en longitud de onda, mientras que la tabla 1 presenta una comparación entre las longitudes de onda asignadas a los picos numerados en la figura 9 y las obtenidas mediante una ecuación de regresión lineal. Se observa que la máxima desviación entre los valores nominales y los obtenidos mediante la ecuación de ajuste, es de unos 2,7 nanómetros. Esta desviación máxima se reduce a 0,5 nanómetros si se emplea un ajuste de regresión cuadrática, no mostrado aquí.



Figura 8. Espectro de emisión de una lámpara fluorescente compacta.

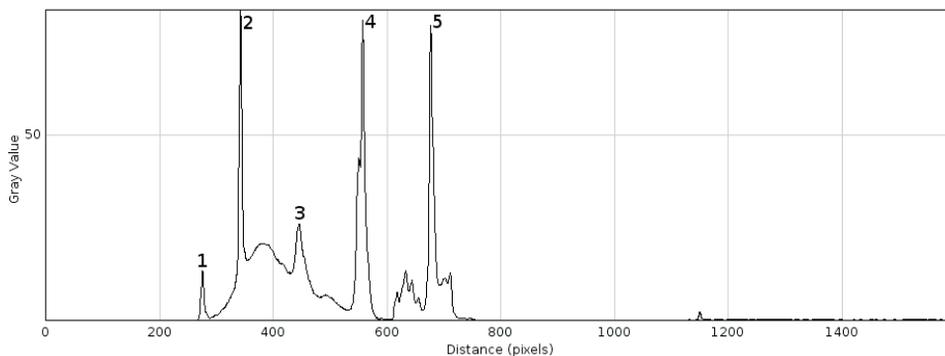


Figura 9. Asignación de longitudes de onda a los picos espectrales de la figura 8.

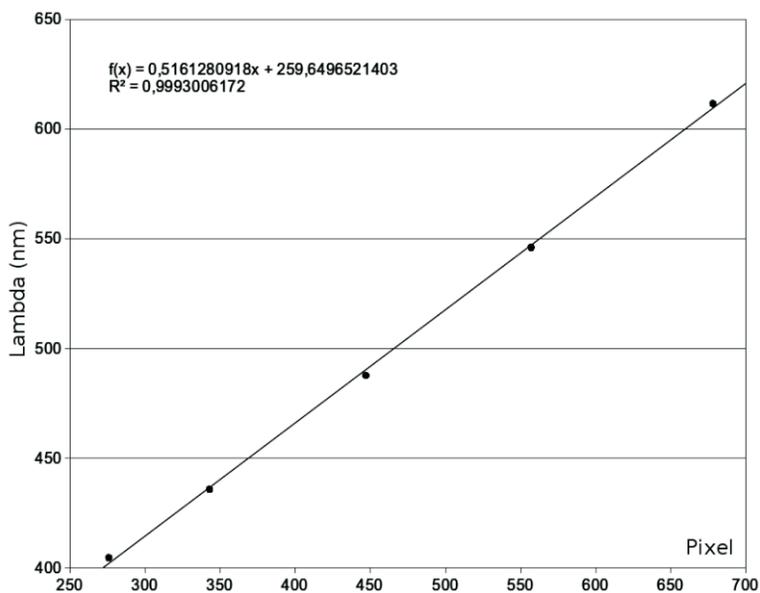


Figura 10. Recta de calibración del espectrómetro en longitud de onda.

Tabla 1. Calibración del espectrómetro en longitud de onda.

Pico	Píxel	λ nominal (nm)	λ calculada (nm)	Diferencia
1	276	404,7	402,1	2,6
2	343	435,8	436,7	- 0,9
3	447	487,7	490,4	- 2,7
4	557	546,1	547,1	- 1,0
5	678	611,6	609,6	2,0

La figura 11 presenta una curva de absorbancia versus concentración, a 525 nanómetros, para soluciones de KMnO_4 . Puede observarse que la curva cumple con la ley Beer – Lambert, lo que muestra que el espectrómetro propuesto es adecuado para el propósito del análisis fotométrico cuantitativo, hasta valores de absorbancia de por lo menos 2,1. Esto significa que la radiación parásita del espectrómetro es notablemente baja. Llama la atención la dispersión relativamente alta de los datos, alrededor de la recta de regresión. Habiendo comprobado los autores que la fuente de luz y la cámara web son extraordinariamente estables, la causa más probable es la imperfección del porta-celda, que permite una apreciable incertidumbre en el posicionamiento de la cubeta. Actualmente se trabaja en la corrección de este problema.

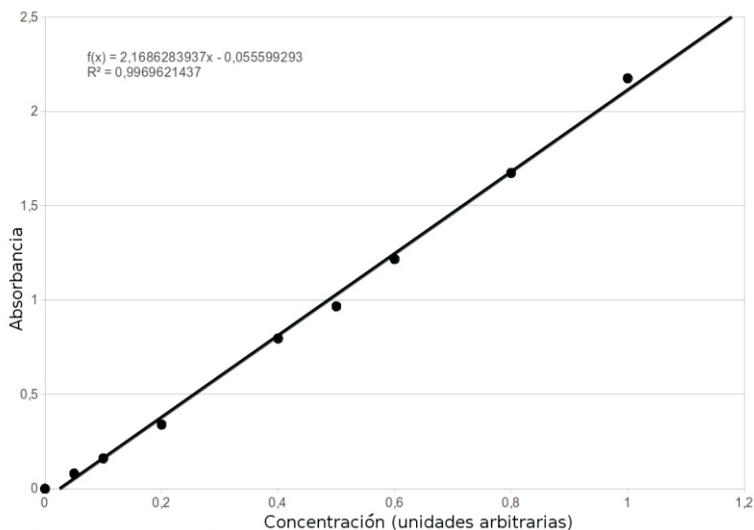


Figura 11. Curva de absorción versus concentración para soluciones de KMnO_4 .

La figura 12 muestra el espectro de fluorescencia verde del pigmento fluorescente extraído con agua, de un plumón marcador amarillo. La excitación se realizó en un ángulo de 90 grados con respecto al detector, con un LED violeta centrado en 390 nanómetros. Puede observarse que el espectro de fluorescencia es de buena calidad y no se detecta la señal de excitación. Cabe mencionar que iluminando la muestra en un ángulo de 90 grados, también se ha logrado hacer mediciones cuantitativas de turbidez, que no se muestran aquí.

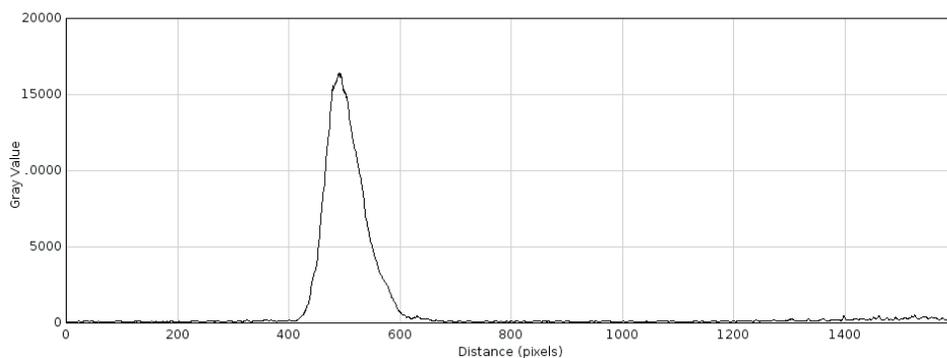


Figura 12. Espectro de fluorescencia del pigmento de un plumón marcador amarillo.

Las figuras 13 y 14 muestran, respectivamente, una imagen del espectro de emisión del sodio en la región visible y su correspondiente gráfica de intensidad en función de la columna de píxeles (eje de abscisas). Puesto que el máximo de intensidad cae en el valor de abscisa de 638, empleando la ecuación que aparece en la figura 10, se calcula que la longitud de onda del pico de emisión es de 589 nanómetros. Puede observarse también que no se llega a resolver el doblete que constituye la línea D del sodio, debido a la limitada resolución de la cámara web empleada, en comparación con la empleada por Wakabayashi et al² y a que no se ha usado rendija de entrada. El ancho de media altura, del pico mostrado en la figura 14 es de 04 canales, que multiplicados por la pendiente de la ecuación mostrada en la figura 10, dan como resultado una resolución de 2,06 nanómetros.



Figura 13. Imagen del espectro de emisión del sodio en la región visible.

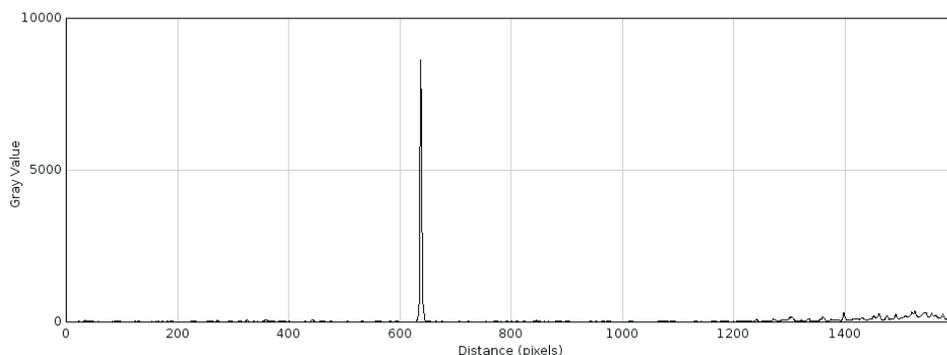


Figura 14. Perfil de intensidad correspondiente a la imagen de la figura 13.

Además de su costo notablemente bajo, otra ventaja importante es que el versátil espectrómetro descrito en este trabajo puede ser construido por los estudiantes. Aunque para esta tarea no se requieren conocimientos de electrónica, sí es necesario tener alguna práctica en la programación de computadoras. Por otra parte, el que los estudiantes tengan que programar todos los algoritmos necesarios para procesar los datos, partiendo de la información contenida en las fotografías y llegando a mediciones fotométricas válidas, es una magnífica oportunidad para que los estudiantes comprendan el proceso de la medición y no se tornen meros “apretadores de botones”.

El uso de una cámara fotográfica como detector es otra característica de alta tecnología, ya que permite la captura simultánea de todas las longitudes de onda del espectro, entre 390 nm y 650 nm, que corresponde al intervalo de longitudes de onda al que responde la cámara usada. Finalmente, el uso de una computadora para operar el instrumento, permite la adquisición, presentación, procesamiento y registro de los espectros de absorción y emisión, a condiciones controladas por el experimentador.

En efecto, una de las funciones de la computadora es elegir los valores apropiados de los parámetros de operación de la cámara, tales como foco, tiempo de exposición, brillo, contraste, saturación, ganancia, etc. Es importante enfatizar que una vez que se ha elegido un juego de valores de los parámetros, apropiado para un experimento dado, se deben mantener constantes durante todo el trabajo. Especialmente si se busca obtener resultados cuantitativos. Por este motivo, no se debe emplear nunca cámaras automáticas, ya que éstas cambian permanentemente los valores de sus parámetros de operación, en función de la luz que reciben, para tratar de obtener siempre las mejores imágenes posibles.

La versatilidad del instrumento, que puede ser usado para experimentos de diversas técnicas ópticas de análisis químico, se debe en gran medida al uso de una fibra óptica como medio de entrada de luz, ya que esto le permite adaptarse fácilmente a diferentes requerimientos experimentales. Finalmente, la tabla 2 muestra una lista de partes selectas y sus costos respectivos, que dan un total de 350,00 soles.

Tabla 2. Lista de partes y costos de las mismas.

Parte	Costo en soles
Cámara web <i>Logitech Quick Cam Pro 9000</i>	264,00
Cable de fibra óptica	24,00
Placa de aluminio	20,00
Pintura negra mate <i>ABRO SPRAY PAINT</i>	10,00
Otros (DVD, lata contenedora, <i>MOLDIMIX, etc.</i>)	32,00

CONCLUSIONES

El espectrómetro construido es confiable, robusto y adecuado para trabajo fotométrico cuantitativo y cualitativo en la región visible, hasta 650 nm. Su construcción es tan simple que puede ser realizada por los estudiantes, individualmente o en grupos pequeños y no se requieren conocimientos de electrónica. El costo es notablemente bajo, y la parte más cara es la cámara web.

REFERENCIAS

1. Wakabayashi F, Hamada K. A DVD Spectroscope: A Simple, High-Resolution Classroom Spectroscope. *Journal of Chemical Education* 2006; 83(1): 56-58.
2. Wakabayashi F. Resolving Spectral Lines with a Periscope-Type DVD Spectroscope. *Journal of Chemical Education* 2008; 85(6): 849-853.
3. Lema MA, Aljinovic M, Lozano ME. Using a Homemade Spectrophotometer in Teaching Biosciences. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2002; 30(2): 106-110.
4. Knagge K, Raftery D. Construction and evaluation of a LEGO Spectrophotometer for Student Use. *Chem. Educator* 2002; 7: 371-375.
5. Heredia Avalos S. Cómo Construir un Espectroscopio Casero con un CD. *Rev. Eureka Enseñ. Divul. Cien.* 2009; 6(3): 491-495.
6. Sorouraddin MH, Saadati M. Simple, Cheap and Portable Colorimeter for introductory Analytical Chemistry Laboratories. *Chemistry* 2009; 18(6): 176-182.

7. Sorouraddin MH, Saadati M, Samadi A. A Simple and Cheap Device for Colorimetric Determination of Serum Iron. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2010; 57: 56-61.
8. Gordon J, James A, Harman S, Weiss K. A Film Canister Colorimeter. *Journal of Chemical Education* 2002; 9(8): 1005-1006.
9. Mozo JD, Galán M, Roldan E. Application of Light Emitting Diodes to Chemical Analysis: Determination of Copper in Water. *Journal of Chemical Education* 2001; 78(3): 355-357.
10. Suzuki Y, Endo M, Jin J, Iwase K, Iwatsuki M. Tristimulus Colorimetry Using a Digital Still Camera and its Application to Determination of Iron and Residual Chlorine in Water samples. *Analytical Sciences* 2006; 22: 411-414.
11. Farooq Wahab M. Fluorescence Spectroscopy in a Shoebox. *Journal of Chemical Education* 2007; 84(8): 1308-1312.

INFORMACIONES

A. De la Sociedad Química

Conferencias de los "Jueves Científicos"

- "Las pseudociencias y sus fraudes", a cargo del Dr. Mario Ceroni Galloso, el día jueves 6 de diciembre del 2012.
- "Nuevos materiales nano-estructurados para la fabricación de sensores electroquímicos", a cargo del Dr. Adolfo La Rosa-Toro Gómez, el día miércoles 12 de diciembre del 2012.
- "Preparación y caracterización de carbones activados químicamente y su uso en el tratamiento de efluentes industriales que contienen cadmio", a cargo de la M.Sc. Jacqueline Peralta Arroyo, el día jueves 17 de enero del 2013.
- "Modelamiento computacional de polímeros con aplicaciones en biología y nanotecnología", a cargo del Dr. Eduardo Cruz-Chu, el día jueves 31 de enero del 2013.
- "Efecto del uso combinado de "maca negra" (*Lepidium meyenii*) y granada (*Punica granatum*) sobre el estrés oxidativo causado por acetato de plomo", a cargo del B.Sc. Frank J. Peralta Álvarez, el día jueves 28 de febrero del 2013.
- "Espectroscopía atómica: enfoque para la elección de la mejor solución analítica", a cargo de la Quím. Mercy Macalupu Guerra, el día jueves 7 de marzo del 2013.
- "Determinación cuantitativa por activación neutrónica del contenido de nitrógeno en muestras de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)", a cargo del **Dr. Ramón Leonardo Soto Morán**, el día **miércoles 13 de marzo del 2013**

Nuevas cuotas anuales y de ingreso

El Consejo Directivo de la Sociedad Química del Perú acordó fijar las nuevas tasas anuales y la cuota de ingreso a partir del 2013, como sigue:

TASAS 2013	CUOTA ANUAL*	CUOTA INGRESO
Socio activo	S/. 180,00	S/. 180,00
Socio adherente	S/. 75,00	S/. 75,00

* Puede abonarse en dos partes semestrales.

Nuevo Consejo Directivo de la Sociedad Química del Perú

En la Asamblea General celebrada el día martes 12 de marzo del presente fue elegido el nuevo Consejo Directivo para el bienio 2013 - 2015.

Presidente	: Dr. Mario Ceroni Galloso
Vice-Presidente	: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui
Secretario General	: Q.F. Juan José León Cam
Tesorera	: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo
Secretario del Consejo Directivo	: Mg. Alberto Corzo Lucioni
Directora de Biblioteca	: Q.F. Gabriela Soriano Chávez
Vocales	: Dr. José Róger Juárez Eyzaguirre
	Ing. Quím. Ana María Osorio Anaya
	M.Sc. Graciela Silvia Untiveros Bermúdez
	Quím. Neptalí Ale Borja
	Q.F. Nora Herrera Hernández
	Mg. Hélder Helí Lezama Vigo
	Dr. Juan Manuel Parreño Tipián
	Mg. Juan Edmundo Estrada Alarcón

31° Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ-2014) XXVII Congreso Peruano de Química

Continuando con su importante misión institucional, la Sociedad Química del Perú (SQP), con el auspicio de la Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas (FLAQ) organiza el **31° Congreso Latinoamericano de Química CLAQ-2014** y el **XXVII Congreso Peruano de Química**, que se realizarán del 14 al 17 de octubre de 2014 en el Sheraton Lima Hotel & Convention Center, en la ciudad de Lima, Perú.

Ambos eventos se desarrollarán a través de:

Plenarias y Conferencias, que estarán a cargo de especialistas principalmente latinoamericanos y versarán sobre temas de gran importancia para nuestra región.

Mesas redondas, donde se discutirá temas de gran interés, como son: las carreras universitarias de química, química verde, seguridad alimentaria, el futuro de las líneas de investigación en Latinoamérica, las investigaciones colaborativas entre instituciones latinoamericanas, la relación Química y Sociedad, entre otros.

Trabajos de investigación, que se presentarán en forma de pósteres, donde los especialistas tendrán un medio para exponer sus investigaciones, recibir sugerencias y realizar contactos académicos.

Cursos, dictados por especialistas con el fin de actualizar los conocimientos de los profesionales químicos.

La FLAQ y la SQP, como siempre, posibilitan mediante este CLAQ-2014, un punto de encuentro donde los químicos latinoamericanos puedan dar a conocer sus investigaciones y establecer colaboraciones entre académicos, profesionales y estudiantes.

Mario Ceroni Galoso
Presidente del Comité Organizador

Miembros del Comité Organizador

Presidenta Honoraria: *Olga R. Lock Sing*
Presidente: *Mario Ceroni Galoso*
Secretaria Ejecutiva: *Ana María Muñoz Jáuregui*
Directora de Conferencias: *María del Rosario Sun Kou*
Directora de Mesas Redondas: *Nora Herrera Hernández*
Directora Científica: *Ana Cecilia Valderrama Negrón*
Tesorera: *Flor de María Sosa Masgo*
Director de Organización: *Manuel Otiniano Cáceres*
Director Administrativo: *Neptalí Ale Borja*
Director de Publicaciones: *Helmer Lezama Vigo*
Director de Relaciones Públicas y Protocolo: *Juan José León Cam*
Director de Cursos: *Graciela Untiveros Bermúdez*
Directora de QUIMITEC: *Angélica Rodríguez Best*

Secciones del Congreso

Química Analítica
Química Inorgánica
Química Orgánica
Fisicoquímica
Bioquímica
Educación Química
Química de los Alimentos
Química Ambiental
Química Cosmética
Química Industrial
Química de Materiales
Química Médica
Química de Polímeros
Química de los Productos Naturales
Química Teórica y Computacional
Química Verde
Historia y Filosofía de la Química

Instrucciones para el envío de resúmenes

Los resúmenes de los trabajos de investigación que se presenten deberán ser originales y versar sobre temas relacionados a las diferentes secciones del Congreso. Los autores de los resúmenes abonarán su inscripción al Congreso según sea la fecha de envío de sus resúmenes de investigación a la Directora Científica. Se ha habilitado el correo electrónico claq2014@gmail.com de uso exclusivo para orientar a los investigadores con mayor detalle.

Valor de la inscripción (dólares americanos)

	Hasta el 30 de abril 2014	Del 1 de mayo al 31 de agosto 2014	Después del 31 de agosto 2014
Profesionales	350,00	420,00	500,00
Estudiantes de postgrado*	250,00	300,00	360,00
Estudiantes de pregrado*	150,00	180,00	215,00

* Deberán acreditar su condición.

Lima: Ciudad histórica, hospitalaria, divertida y gourmet

El CLAQ-2014 se realizará en la ciudad de Lima, capital y centro histórico del Perú que tiene para disfrutar una sorprendente arquitectura colonial rodeada de bellas plazas, variedad de parques, museos e iglesias. Su asombrosa vida nocturna permite disfrutar la alegría en sus discotecas o degustar de la más variada y exquisita comida. Lima está conectada por vía aérea gracias al aeropuerto Internacional Jorge Chávez -elegido el mejor aeropuerto de Sudamérica- donde llegan vuelos de todas partes del mundo y de las principales líneas aéreas comerciales, desde el cual parten los vuelos a todos los lugares turísticos situados en la costa, sierra y selva con tiempo de vuelo cercano a una hora.

Fechas importantes

Inicio de inscripciones: 1 de enero de 2014.

Recepción de los resúmenes de investigación: del 1 de enero al 31 de agosto de 2014. No se garantiza que los resúmenes enviados después del 31 de agosto sean publicados en el Libro de Resúmenes.

Informes

Sociedad Química del Perú, Av. Nicolás de Araníbar 696, Santa Beatriz, Lima 01. Teléfono 00-51-1-472-3925. Atención de lunes a viernes de 10:00 a 13:00 y de 15:30 a 18:30 horas.

sqperu@gmail.com

www.sqperu.org.pe

<http://claq2014.blogspot.com>

Presentación del libro “Koordinationschemie”

El pasado lunes 18 de marzo del presente, la Sociedad Química del Perú tuvo el honor de presentar el libro “Koordinationschemie”, Editorial Springer, Año 2012, en idioma alemán, de los autores Dr. Jorge Angulo Cornejo y Dr. Lothar Beyer.

Conocedores de la destacada trayectoria de nuestro socio Dr. Jorge Angulo Cornejo, quien ha ocupado diversos cargos durante varios años en nuestra institución, y de nuestro siempre recordado con afecto, Socio Honorario Dr. Lothar Beyer, estamos seguros que será un material bibliográfico de gran aporte en el campo de la Química de Coordinación.



Sensible pérdida:

Con profundo pesar comunicamos el fallecimiento de nuestro Socio Vitalicio Ingeniero Químico Germán de la Fuente Herrera.

La Sociedad Química del Perú, expresa sus más sentidas condolencias a los familiares y amigos por tan irreparable pérdida.

B. Otras informaciones

Juramentación del Consejo Nacional 2013 - 2015 del Colegio de Químicos del Perú

El miércoles 30 de enero tuvo lugar la ceremonia de juramentación del nuevo Consejo Nacional del Colegio de Químicos del Perú, en el auditorio del Colegio de Ingenieros, conformado por:

Presidenta - Decana	: Emma Patricia Morales Bueno
Vicepresidente - Vicedecana	: Ana Letty Manrique Tito.
Secretario	: Daniel Adolfo Alcántara Malca
Tesorera	: Pilar Juana Caso Caballero
Vocales	: José Humberto Catacora Gonzales Nery Ugarte Tito

La Sociedad Química del Perú expresa sus sinceras felicitaciones al nuevo Consejo Nacional del Colegio de Químicos y les desea los mejores éxitos en su gestión.

Edición gráfica:
ESERGRAF
Jr. Los Halcones 293
Bellavista - Callo
Telf.: 998-513-545
mig5548@yahoo.com

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

SOCIOS HONORARIOS

Dr. Mario J. Molina (México)
Dra. Olga Lock Sing (Perú)
Dr. Antonio Monge Vega (España)
Dr. Lothar Beyer (Alemania)

SOCIOS CORRESPONDIENTES

Dr. Aiache, Jean-Marc (Francia)
Dr. Cea Olivares, Raymundo (México)
Dr. Chifa, Carlos (Argentina)
Dra. Cascales Angosto, María (España)
Dr. Del Castillo García, Benito (España)
Dr. De Simone, Francesco (Italia)
Dr. García-Herbosa, Gabriel (España)
Dr. Infante, Gabriel A. (Puerto Rico)
Dr. Joseph-Nathan, Pedro (México)
Dr. Mors, Walter B. (Brasil)
Dr. San Feliciano, Arturo (España)
Dr. Suwalski, Mario (Chile)
Dr. Vicente Pérez, Santiago (España)



Cumple 80 años
(1933 - 2013)