

Estudio fitoquímico y efecto antiulceroso del extracto acuoso de hojas *Vallea stipularis* L.f. «chuillur» en ratas

Pablo Bonilla Rivera*, Jorge Arroyo Acevedo* y Juana Chávez Flores**

Resumen

Se realizó el estudio fitoquímico y la determinación de la actividad antiulcerosa de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur». La especie fue ubicada y recolectada en marzo de 2000, en el distrito de Tamburco, provincia de Abancay departamento de Apurímac, a 3.100 m.s.n.m. Con la muestra pulverizada de hojas se realizó una maceración acuosa. Mediante una marcha fitoquímica se detectaron compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, esteroides, saponinas y carbohidratos. Para el análisis cromatográfico en capa fina analítica, en escala preparativa, se utilizó el sistema de solventes: CHCl_3 - EtOH (9:1), la elucidación estructural se realizó por espectroscopía UV-visible e IR; se determinaron cuatro fracciones probables: F1: 5,7-dihidroxi-6-metoxiflavona, F2: 5-hidroxi-7-O-glucosilflavona, F3: p-propil fenol y F4: 2,4-dihidroxipropilbenceno.

La actividad antiulcerosa se determinó por la técnica de Lee 1971, induciendo úlcera gástrica en estómago de rata cepa Holtman; el tratamiento con mayor eficacia fue el extracto acuoso de hojas a dosis de 600 mg/Kg observándose una inhibición del 62% comparado con el grupo patrón que obtuvo un 18% de inhibición. *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur» presenta actividad antiulcerosa por vía intragástrica; dicha actividad probablemente se debe a la presencia de flavonoides en el extracto acuoso de hojas. Al evaluar la toxicidad aguda a dosis límite del extracto acuoso de hojas en ratones albinos especie *Mus musculus* cepa Balb/c, se ha determinado que no produce mortalidad a la dosis máxima de 2.000 mg/Kg, y en el estudio anatomopatológico de sus órganos no se registro daño, por lo que se le califica como «No clasificado».

Palabras clave: *Vallea stipularis* L.f. Chuillur, úlcera gástrica, toxicidad aguda, compuestos fenólicos.

Introducción

Desde la antigüedad la medicina tradicional ha desempeñado un rol importante aliviando las enfermedades y el dolor. Actualmente existe un gran interés por el mejor conocimiento y uso de medicinas alternativas, entre las que destaca la medicina natural. El presente trabajo es un aporte al estudio fitoquímico y farmacológico de *Vallea stipularis* L.f.; de nombre vulgar «Chuillur». La clasificación taxonómica fue determinada en los laboratorios del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur» es un arbusto de 2 a 3 metros de altura, con frutos redondeados pequeños con protuberancia en su superficie, se desarrolla a una temperatura media anual 10-17°C y se encuentra entre 2.200 a 3.200 m.s.n.m.^{1,2}. El género *Vallea*, posee dos especies en habitat desde Venezuela hasta Bolivia, una de ellas, nativa del Perú: *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur»^{1,3}. A esta especie se le conoce también como: achacapuli, cugur, crosckash, chchicllur, chuillur (Tamburco), chijllurmay (Cusco), gorgor, yongasil⁴ sacha capuli, olla-olla, tchillurnay^{5,6,7}. Es una planta de la región andina, empleada por las comunidades campesinas para el tratamiento de: escorbuto, cicatrizante, gastritis, reumatismo³, como purgante drástico y analgésico.

La importancia de la presente investigación radica en brindar un aporte al estudio fitoquímico y farmacológico de la especie vegetal *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur» a la que se atribuyen tradicionalmente muchas propiedades medicinales que aún no han sido estudiadas; por este motivo se planteó el estudio de la actividad antiulcerosa del extracto acuoso de las hojas de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur». Por lo expuesto, los objetivos específicos del proyecto fueron determinar los metabolitos secundarios del extracto acuoso de

* Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM

** Docente Universidad Norbert Wiener

hojas de *Vallea stipularis* L.f., aislar el metabolito que se encuentre en mayor proporción por cromatografía en capa fina y en escala preparativa, determinar la toxicidad aguda del extracto de «Chuillur» *Vallea stipularis* L.f. en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/c y verificar los cortes anatomopatológicos de órganos (hígado, pulmón y riñón); demostrar el efecto antiulceroso del extracto acuoso de hojas de *Vallea stipularis* L.f. en ratas cepa Holtzman por vía oral y verificar los cortes anatomopatológicos seriados del estómago en el estudio preclínico.

Material y métodos

1. Encuesta etnofarmacológica

Se realizó en la comunidad de San Antonio, distrito de Tamburco, provincia Abancay, departamento de Apurímac. Las personas encuestadas fueron seleccionadas al azar considerando como únicos requisitos, que fueran personas adultas y habitantes de la zona de estudio.

2. Clasificación botánica

2.1. Taxonomía

Determinada según el sistema de Engler y Prantl, modificado por Melchor (1964)⁷; dicha clasificación se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

3. Preparación del extracto acuoso para el estudio fitoquímico, farmacológico y toxicológico⁸

3.1. Recolección

Se recolectó 10 kilos de la especie *Vallea stipularis* L.f «Chuillur» en el marzo de 2000, de la comunidad de San Antonio, ubicada a 3.200 m.s.n.m. en el distrito de Tamburco provincia Abancay departamento de Apurímac.

3.2. Desecación

Las hojas de *Vallea stipularis* L.f «Chuillur» se desecaron en estufa a 40°C.

3.3. Molienda

Se utilizó molino de cuchillas Willey Hill St. Model N°3, obteniéndose un polvo fino.

4. Preparación del extracto acuoso⁸.

Se pesó 100 g del polvo seco; se añadió 1000 mL de agua destilada se sometió a una temperatura de

100°C, se agitó por una hora, luego se filtró y se concentró en la estufa a 40°C para obtener al final un extracto seco.

5. Ensayos preliminares

5.1. Prueba de solubilidad

Se realizó en solventes de polaridad creciente⁹: benceno, acetona, n-butanol, etanol, metanol, agua destilada, n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y éter de petróleo.

5.2. Marcha fitoquímica

La detección de constituyentes químicos del extracto acuoso se realizó siguiendo la marcha fitoquímica general^{9,10,11}.

6. Análisis cromatográficos

En la cromatografía en capa fina^{12,13}, se usó como sistema de solventes: CHCl₃ - EtOH (9:1) v/v, presentándose cuatro manchas a luz UV/V 365nm, luego se realizó la cromatografía en escala preparativa y fueron reveladas con los reactivos FeCl₃ (sol. 1%), H₂SO₄ (sol. 50%), AlCl₃ (sol. 1%) y NH₄OH, luz UV 365 nm.

7. Aislamiento, purificación e identificación

En la cromatografía en escala preparativa (CEP) se detectó la presencia de 4 fracciones que verificadas a la luz UV de 365nm., con reveladores y reacciones de color dieron positivas para compuestos fenólicos^{9,14}. A estas 4 fracciones se eluyó con MeOH y CHCl₃, filtró y llevó a sequedad.

8. Análisis espectrofotométrico

Las 4 fracciones (F1, F2, F3 y F4) se analizaron por espectroscopia UV/V¹⁵ e infrarrojo.

9. Estudio farmacológico

9.1. Determinación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de hojas de «Chuillur» en ratones albinos *Mus musculus* cepa Balb/c por vía oral¹⁶.

Se formaron dos grupos de tres ratones del mismo sexo. Se observó el comportamiento de los animales durante 14 días.

Se consideró los signos y síntomas observados y se controló los pesos al inicio, a los 7 días de administración y al finalizar el experimento si el caso así lo requería. Se realizó la necropsia a todos

los animales al final del experimento y se evaluó, peso, coloración y tamaño de los diferentes órganos. El sacrificio de los animales por el método de dislocación cervical, separación del cráneo de la columna espinal, aplicando presión en la base del cráneo y la columna cervical, lográndose la pérdida de sensibilidad al dolor¹⁷.

10. Efecto antiulceroso

Inducción de úlcera gástrica experimental en ratas, método de Lee 1971¹⁸

Se utilizaron 70 ratas cepa Holtzman (hembras) n=10, 250-280 g de peso al inicio de los ensayos, se las mantuvo en ayunas de 24 horas, dejándolos únicamente con agua ad libitum.

Descripción de la técnica

70 ratas cepa Holtzman se distribuyeron aleatoriamente en 7 grupos de 10 animales cada uno: 1^{er} Grupo control: Suero fisiológico 5mL/Kg. 2^{do}. Grupo control positivo: Indometacina 80mg/Kg. 3^{er}. Grupo control farmacológico: Ranitidina 50 mg/Kg. 4^{to}, 5^{to}, 6^{to} y 7^{mo} Grupo problema: Extracto acuoso de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur» 100 mg/Kg, 300 mg/Kg, 600 mg/Kg y 800 mg/Kg.

Los productos mencionados se administraron vía oral. Una hora antes de la administración de indometacina según la dosificación anteriormente enunciada. Los animales fueron sacrificados al transcurrir 1 y 6 horas desde la administración de indometacina, e inmediatamente se les efectuó una laparotomía en el tercio anterior de la línea media abdominal. Se extrae el estómago abierto por la curvatura mayor, se lavó cuidadosamente con una corriente suave de solución fisiológica. Se extienden los estómagos sobre una tabla de tecnopor mediante alfileres, observándose las úlceras formadas y procediendo a sus valoraciones de acuerdo a la escala de Marhuenda¹⁹. El puntaje total se expresa en porcentaje de inhibición respecto al índice de ulceración del grupo control.

11. Cortes anatomopatológicos del estómago de las ratas de experimentación

Los estómagos se conservaron en una solución de formol al 10% para posterior estudio y determinación del daño patológico.

Resultados

Estudio fitoquímico

Pueden observarse los resultados del estudio fitoquímico en las Tablas I y II.

La prueba de solubilidad del extracto acuoso «Chuillur» se muestra en la Tabla 1. Se observa su solubilidad en metanol, de donde se deduce que los componentes químicos mayoritarios son de estructura y naturaleza polar⁹.

Tabla 1. Prueba de solubilidad del extracto acuoso de hojas de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur»

Solvente	Solubilidad
Agua destilada	++
Etanol	++
Metanol	+++
n-Butanol	++
Acetato de etilo	+
Cloroformo	+
Benceno	-
Acetona	-
Éter de petróleo	-
n-Hexano	-

(-) insoluble, (+) poco soluble, (++) soluble y (+++) muy soluble.

La marcha fitoquímica permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos de la planta⁹. En la Tabla 2 se muestra los resultados de la marcha fitoquímica de la especie vegetal, *Vallea stipularis* L.f.: flavonoides, taninos, compuestos fenólicos, aminoácidos, carbohidratos y en menor concentración alcaloides, esteroides y saponina esteroidales.

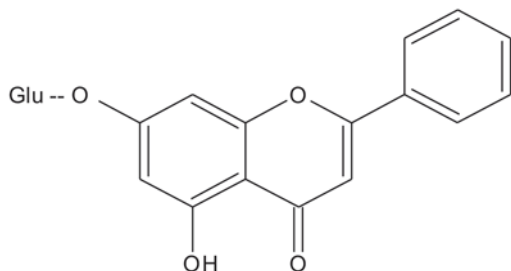
Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto acuoso de hojas de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur»

Reactivo	Metabolitos primarios y secundarios	Resultado
Tricloruro de aluminio	Flavonoides	+++
Shinoda	Flavonoides	+++
Tricloruro férrico 1%	Compuestos fenólicos	+++
Benedict	Carbohidratos	+++
Molish	Carbohidratos	+++
Gelatina-sal 1%	Taninos	+++

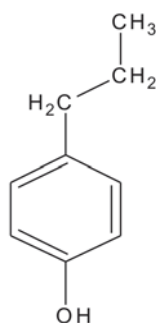
Reactivo	Metabolitos primarios y secundarios	Resultado
Bertran	Alcaloides	++
Dragendorff	Alcaloides	++
Mayer	Alcaloides	++
Popoff	Alcaloides	++
Wagner	Alcaloides	++
Liebermann - Burchard	Esteroides	++
Salkowski	Esteroides	++
Fehling A,B	Azúcares reductores	+++
Indice afrosimétrico	Saponina esféricas	++
Ninhidrina 1%	Aminoácidos	++

(++) Moderado y (+++) Abundante

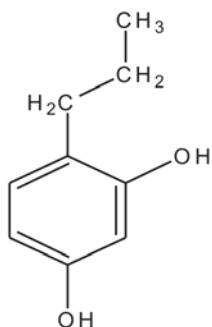
Fig. 1: Estructuras químicas de los compuestos fenólicos presentes en las fracciones 1, 2, 3 y 4 del extracto de hojas de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur»



Fracción 2:5 - hidroxí - 7 - 0 - glucosilflavona



Fracción 3:
Fenil propanoide
«p - propil fenol»



Fracción 4:
Fenil propanoide
2, 4 dihidroxipropilbenceno

Estudio toxicológico

Toxicidad aguda en dosis límite 2.000 mg/Kg^{18,19}

En la evaluación de la toxicidad aguda por vía intragástrica del extracto acuoso de hojas de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur», no se presentó mortalidad a la dosis de 2.000 mg/Kg, en los cortes anatomopatológicos no se evidenció daño ni modificaciones en sus órganos (pulmón, hígado y riñón).

Actividad antiulcerosa

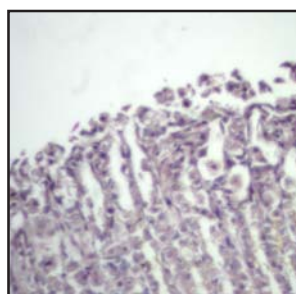


Fig. 2: Rata tratada con el extracto acuoso dosis 100 mg/Kg, se observa descamación superficial, núcleos picnóticos

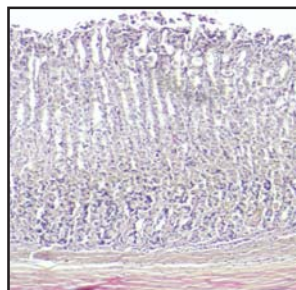


Fig. 3: A dosis de 300 mg/Kg, se observa alteraciones en la estructura del estómago, desorganización de la arquitectura glandular, picnosis en las células fúndicas.

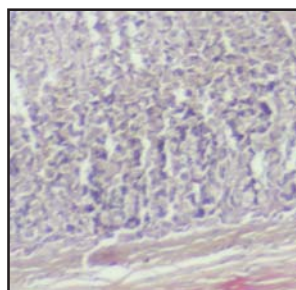


Fig. 4: Rata tratada con el extracto acuoso dosis 600 mg/Kg, se observa poca desorganización de la estructura glandular.

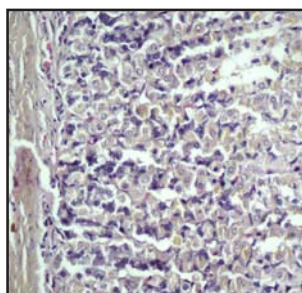


Fig. 5: A dosis de 800 mg/Kg no se observa cambios en su estructura, se demuestra las glándulas bien orientadas sin daño nuclear (buena protección).

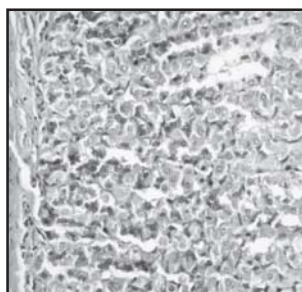


Fig. 6: Rata tratada con indometacin 80 mg/Kg, se observa discariosis

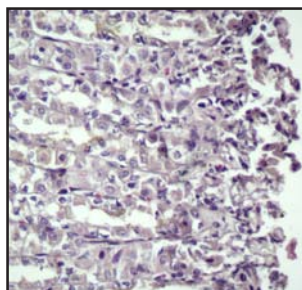


Fig. 7: A dosis de 50 mg/Kg con ranitidina, se aprecia picnosis en las células fúndicas.

Discusión

La etnobotánica medicinal estudia el uso etnomédico de la flora, propiedades curativas de la planta, las técnicas utilizadas para obtener información de la especie *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur»; son las encuestas que permiten conocer la relación entre la flora de un lugar y el hombre, es necesario el contacto directo con la población, que permita obtener una información confiable.

Mediante el análisis cromatográfico en capa fina, teniendo en cuenta la polaridad de flavonoides se obtuvo mejores resultados con el sistema de solventes $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (9:1); la detección de flavonoides en cromatografía en capa fina y cromatografía en escala preparativa, se debe al color de la fluorescencia que desarrollan a la luz UV, que

se intensifican o cambian de color luego de la exposición a vapores de amoníaco⁹. Se realizó la cromatografía en escala preparativa, usando como sistema de solventes $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ (9:1); se observó 7 manchas, se analizó 4 fracciones, que se revelaron con sol. FeCl_3 1%, sol. AlCl_3 1% y sol. H_2SO_4 50%, en presencia de vapores de amoníaco; el color amarillo observado, indicaría la presencia de flavonas y/o flavonoles^{9,11}.

Para la elucidación estructural del extracto acuoso de «Chuillur», se realizó el análisis espectroscópico, UV/Visible e IR del referido análisis se obtuvieron las posibles estructuras químicas: F1: 5,7 - dihidroxi-6-metoxiflavona, F2: 5- hidroxí-7-O-glucosilflavona, F3: Fenil propanoide «p - propil fenol» y F4: Fenil propanoide 2,4 - dihidroxí-propilbenceno.

El efecto antiulceroso se explicaría por la presencia de flavonoides y saponinas esteroidales en *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur», como se muestra en la Tabla 2, dado que los flavonoides y saponinas interfieren en el metabolismo de las prostaglandinas, especialmente PGE_2 , que son responsables de la inhibición de la secreción de ácido clorhídrico producido por el mucocitoprotector (Araujo et al 2002)^{20,21}.

Se utilizó la prueba de t - student, para validar los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antiulcerosa de *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur», observándose en la figura 4 y 5, que el tratamiento con el extracto acuoso es efectivo a las dosis de 600 y 800 mg/Kg en comparación con el grupo 5 (agente agresivo), existiendo una diferencia significativa ($p < 0.01$). El tratamiento con ranitidina (control positivo) no protegió la mucosa a dosis y condiciones utilizadas, no existiendo diferencia significativa ($p < 0.05$). Se observa diferencias significativas entre el tratamiento del extracto 600 mg/Kg y la ranitidina 50 mg/Kg ($p < 0.01$) y del extracto 800 mg/Kg con el mismo fármaco ($p < 0.05$).

La especie *Vallea stipularis* L.f. «Chuillur» es una planta sin efectos tóxicos¹⁶, y con actividad antiulcerosa que ha sido demostrada y corroborada sus propiedades benéficas por lo pobladores de la Comunidad de San Antonio, distrito de Tamburco, provincia Abancay departamento de Apurímac; los estudios preclínicos y clínicos pueden validar el uso farmacéutico al alcance de la población.

Referencias bibliográficas

1. Reynel C, León G. Árboles y arbustos para agroforestería y conservación de suelos. Tomo II las especies. Cusco 1990.
2. Charles B, Kenny J. El verdor de los andes. Proyecto desarrollo forestal participativo en los andes. 1^{ra}. Ed. Quito. 1992.
3. Chulchul. Se consigue:
<http://cuencadelosandesarbolesdelosbosquesdemazan.chulchul.htm> fecha de acceso 03/01/2001.
4. Brack-Egg A. Diccionario enciclopédico de plantas medicinales del Perú. 1^{ra}. Ed. Cusco. 1999.
5. Roersch C. Plantas medicinales en el Sur Andino del Perú. 2^{da}. Ed. Vol. I. Editorial Buho Cusco 1994.
6. Ferreyra R. Flora Del Perú Dicotiledóneas. Editorial Edmissa. Lima 1986.
7. Macbride J. F. Flora of Perú. Fiel Museum of Natural History Vol. XIII, Part IIIA, N° 2 Dec 21, 1956.
8. Miranda-Martínez M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Ciudad de La Habana. 2002.
9. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio de Productos Naturales. 1^{ra}. Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú Fondo Editorial. Lima.
10. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica y plantas Medicinales. 2^{da} Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 2001.
11. Gibaja-Oviedo S. Guía para el análisis de los compuestos del carbono. 1^{ra}. Ed. Lima. 1977.
12. Randerath K. «Cromatografía de capa fina». Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo VIII. 2^{da}. Ed. Editorial Urno. Bilbao 1970.
13. Lederer E, Lederer M. Cromatografía revisión de sus principios y aplicaciones. 2^{da}. Ed. Editorial el Ateneo 1960.
14. Domínguez X. A. Método de investigación fitoquímica. Editorial Limusa México D.F. 2^{da} Ed. 1979.
15. Robert M, Silverstein G, Clayton B, Morrill T. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. 1^{ra}. Ed. Editorial Dana México D.F. 1980.
16. OECD, Guideline for the Testing of Chemicals N°143 (Adopted 22.03.96) Acute toxic class method.
17. Betancourt-Badell J. Cuestiones éticas en la experimentación animal. Doc. 1999. La Habana.
18. Cyted Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Técnicas de investigación en plantas medicinales. 1995.
19. Cyted/CNPD. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para desenvolvimiento. Métodos de evaluación de la actividad farmacológica de plantas medicinales. 2002.
20. Pulz-Araújo C. Preliminar da Atividade Antiulcerogênica do Extracto Hidroalcohólico de *Solanum cernuum* Vell. Acta Bonaerense 2002; 21(4): 283-286.
21. Alarcón de la Lastra C, López A, Motilva V. Gastroprotection and prostaglandin E2 generation in rats by flavonoids of *Dittrichia viscosa*. Plantas Med 1993;59: 497-501.

— o —