

EFFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Rhizophora mangle* SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN HEPÁTICA EN *Rattus rattus* var. *albinus*.

PROTECTIVE EFFECT HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Rhizophora mangle* LIPOPEROXIDATION ON THE LIVER IN *Rattus rattus* var. *albinus*.

Joseph Campos-Ruiz*, Orlando Pretel-Sevillano**

Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú.
josecam_6@hotmail.com*, opretels@yahoo.com**

RESUMEN

Esta investigación se realizó con el propósito de evaluar la acción protectora del extracto hidroalcohólico de *Rhizophora mangle* "mangle" sobre la lipoperoxidación hepática en *Rattus rattus* var. *albinus*. Para la experiencia se consideraron dos controles o testigos; uno de ellos expuestos con tetracloruro de carbono y el otro con suero fisiológico, frente a dos tratamientos con cuatro repeticiones, a los cuales se les agregó el extracto hidroalcohólico de *R. mangle* en concentraciones de 200 y 400 mg/Kg de peso corporal durante tres días para determinar las concentraciones de malondialdehído (que es estequiometricamente igual a los radicales libres formados), mediante la técnica de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Se encontró que los grupos tratados con el extracto hidroalcohólico mostraron reducción en la formación de radicales libres, y nos lleva a concluir que dicho extracto ejerce efecto protector sobre la lipoperoxidación hepática en *Rattus rattus* var. *albinus*.

Palabras clave: Lipoperoxidación, radical libre, extracto hidroalcohólico.

ABSTRACT

This research was conducted in order to evaluate the protective action of the hydroalcoholic extract of *Rhizophora mangle* "mangle" on hepatic lipid peroxidation in *Rattus rattus* var. *albinus*. For two controls were considered experience or witnesses one exposed with carbon tetrachloride and the other with saline, compared to two treatments with four repetitions to which were added the hydroalcoholic extract of *R. mangle* at concentrations of 200 and 400 mg / kg body weight for three days to determine the concentrations of malondialdehyde (which is stoichiometrically equal to the free radicals formed), by the technique of the thiobarbituric acid reactive substances. It was found that the groups treated with hydroalcoholic extract showed reduced free radical formation, and leads us to conclude that the extract exerts protective effect on hepatic lipid peroxidation in *Rattus rattus* var. *albinus*.

Key words: Lipid peroxidation, free radical, hydroalcoholic extract.

Recibido: 9 Diciembre de 2012

Aceptado: 6 de Marzo de 2013

INTRODUCCION

La peroxidación lipídica se asocia con la etiología de diversos padecimientos como el engrosamiento y rigidez de los vasos sanguíneos (arteriosclerosis), que reduce el adecuado suministro de sangre a los tejidos e inflamación de las articulaciones (artritis reumatoidea), inflamación y exceso de mucosidad en los pulmones (enfisema pulmonar), cáncer, y daño al sistema inmune, pulmón, riñón e hígado (Vargas y col, 2007). Esta se origina cuando los radicales de oxígeno, en especial el radical hidroxilo, tienen mucha afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Durante esta unión el radical hidroxilo sustrae un hidrógeno del ácido graso para dar lugar a la formación de un nuevo radical orgánico (iniciación). Seguidamente este radical orgánico se une al lípido vecino y da lugar a un nuevo radical, y así sucesivamente se multiplica, para crear una verdadera reacción en cadena que daña de manera prácticamente irreversible la membrana celular (Piña-Garza; 1996).

Se ha identificado que el estrés oxidativo es responsable de la lipoperoxidación (Kalish y Luzio, 1996). El estrés oxidativo (EO) es el estado fisiopatológico que produce un desbalance entre los

sistemas oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros, por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO), el debilitamiento de los sistemas antioxidantes, o por ambos. Ello implica un aumento en la generación de especies oxidadas tóxicas que conllevan a un deterioro funcional y estructural de células y tejidos (Martínez y col., 2003), y están implicadas en la patología de numerosas enfermedades como el cáncer, enfermedades cardíacas, arterosclerosis, enfermedades cerebrales y envejecimiento (Kohen & Nуска, 2002).

Se ha estimado que aproximadamente 2 % del oxígeno consumido por un organismo normal va a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), de las cuales varias son radicales libres (Chance y col., 1979). En cantidad, las principales especies reactivas del oxígeno que se generan durante la respiración celular son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el que a su vez da origen al radical hidroxilo (OH^{\cdot}). El anión superóxido y el radical hidroxilo son especies altamente reactivas pues poseen uno o más electrones desapareados, son capaces de provocar reacciones en cadena cuyo daño en las membranas celulares puede ser irreversible y llegar incluso hasta la muerte celular (Child y col., 1998).

Varios estudios han demostrado que las plantas producen potentes antioxidantes y representan una importante fuente de antioxidantes naturales; en nuestro país, el uso de plantas medicinales con atribuciones antioxidantes es muy difundido y por ello se están llevando a cabo diferentes estudios sobre su acción farmacológica. Como por ejemplo tenemos los estudios realizados con *Buddleia globosa*, *Piper angustifolium* "maticio" (Placencia, 2001), *Croton palanostigma* "sangre de grado" y *Aloe vera* "savila" (Arroyo, 1998).

Rhizophora mangle tiene varias propiedades para su uso en medicina tradicional. Se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades de la garganta y en la tuberculosis pulmonar (Roig, 1988); así como contra la lepra, el asma, la úlcera péptica, los trastornos digestivos, las infecciones de la piel y las enfermedades venéreas (Rojas & Coto 1978). Además se reportó que tiene actividad anti fúngica (Cáceres y col., 1993). En las últimas décadas se demostraron varias actividades farmacológicas del extracto acuoso de la corteza de *R. mangle*; que incluyen, prevención de mastitis bovina (Armenteros, 1998); eficacia en la curación de las heridas (Bulnes y col., 2001); así como propiedades antimicrobianas (Melchor y col.; 2001); a su vez resulto exitoso en el tratamiento de las infecciones uterinas (Melchor y col., 2001) y las úlceras gastroduodenales (Sánchez y col., 2001), también se demostraron sus propiedades antiinflamatorias (Marrero y col., 2006).

Con extracto acuoso de la corteza de *R. mangle* L. (mangle rojo) se obtuvo polifenoles (54,78%), representados en su mayoría por taninos poliméricos (80 %) y taninos hidrolizables (20 %); en estos últimos se destaca la presencia de epicatequina, catequina, ácido clorogénico, ácido gálico y ácido elágico, además se encontraron galotaninos y elagitaninos. De las estructuras no tánicas, se refiere a la presencia de carbohidratos (17,5 %) libres y enlazados; ácidos grasos (4,0 %) de cadena larga, saturados e insaturados; fitoesteroles (0,0285 %) y aromas o aceites esenciales no volátiles (Sánchez y col., 1998).

Con lo expuesto, objetivo de este trabajo fue determinar el efecto protector del extracto hidrolacohólico de *R. mangle* sobre la lipoperoxidación hepática en ratas, *Rattus rattus* var. albinus y así poder aportar en el conocimiento de las propiedades antioxidantes de esta planta.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

Hojas y cortezas de *Rhizophora mangle* "mangle" fueron recolectadas de los manglares de Tumbes; departamento de Tumbes – Perú, entre mayo – junio 2012. La determinación de la especie se hizo en el Herbarium Truxillense (HUT).

Rattus rattus var. albinus, hembras, fueron adquiridos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, teniendo en cuenta que tengan edad y peso similares.

OBTENCIÓN DE EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO:

Las hojas y cortezas de *R. mangle* "mangle" se sometieron a una limpieza manual para eliminar arena, epifitos y fauna acompañante; se lavó con abundante agua de grifo y luego con agua destilada. Se cortaron las cortezas y hojas en trozos pequeños y secados en estufa a 50°C, para evitar la desnaturalización de algunas biomoléculas termosensibles, luego fueron molidos y tamizados para obtener un polvo fino y luego se hizo una mezcla hidroalcohólica (70% etanol + 30% agua destilada) y se depositó en un frasco ámbar por 6 días con agitación diaria.

Después fue filtrado por 3 veces con papel de filtro Wathman No 1 con ayuda de una bomba de vacío, para eliminar todo residuo orgánico grosero. Este extracto fue sometido a separación de clorofilas con cloroformo en un embudo de separación (las clorofilas se eliminan). El producto líquido obtenido fue evaporado totalmente y el producto seco obtenido fue guardado en refrigeración hasta su uso en los animales con una dosificación establecida para cada uno.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Se hicieron tres repeticiones por cada grupo control, utilizándose al final 42 ratas. Se estableció un grupo control negativo, grupo control positivo, con tres ratas cada uno y dos grupos experimentales; con cuatro ratas cada uno.

Grupo control negativo (GCN): 3 ratas fueron tratadas diariamente con solución salina fisiológica en un volumen del 3 % de su peso corporal por 3 días, vía orogástrica.

Grupo control positivo (GCP): 3 ratas fueron tratadas diariamente con 1 ml de tetracloruro de carbono/ Kg de peso corporal por 3 días, vía orogástrica.

Grupo experimental:

Grupo experimental 1 (GE1): 4 ratas tratadas con 1 ml de tetracloruro de carbono/ Kg del peso corporal más 200 mg de extracto de "mangle" / Kg de peso corporal por 3 días, vía orogástrica.

Grupo experimental 2 (GE2): 4 ratas tratados con 1 ml de tetracloruro de carbono/ Kg del peso corporal más 400 mg de extracto de "mangle" / Kg de peso corporal por 3 días, vía orogástrica.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN HIGADO DE *R. rattus* var. *albinus*:

Obtención del homogenizado de hígado:

En el cuarto día del tratamiento, las ratas fueron anestesiadas y se les realizó una laparotomía a nivel de la línea alba abdominal, se extrajo el hígado, que fue perfundido con solución de Krebs helado y molido en un mortero de porcelana frío y un gramo de este fue homogenizado con 5 ml. de la misma solución en un homogenizador de Potter para los ensayos correspondientes.

MEDICION DE LA FORMACIÓN DE RADICALES LIBRES:

En el homogenizado hepático se midió el grado de lipoperoxidación mediante el método de las sustancias reactivas al ácido Thiobarbiturico (TBARS) en presencia y ausencia de Fe⁺³/Ascorbato (Rio, 2000).

En un tubo de ensayo, se agregó 1.7 mL de solución de Krebs, 0.1 mL del homogenizado del hígado, 0.1 mL de Fe³⁺ (0,0028g/l) y 0.2 mL de ácido ascórbico (0,007 g/L); luego se incubó a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se realizó un desproteínizado con 1 mL de ácido tricloroacético, sometiéndose a ebullición en baño maría por 30 minutos para luego centrifugar a 3 500 rpm por 20 minutos. Se obtuvo el sobrenadante, al cual se le agregó 1 mL de ácido thiobarbiturico, y sometido a ebullición para que reaccione con el malondialdehído, dando una reacción de coloración rosada que se forma como producto de la lipoperoxidación, que equivale estequiometricamente igual a la cantidad de radicales libres, luego se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos; y el sobrenadante fue leído en el espectrofotómetro a 535 nm. Así los valores

obtenidos en absorbancia fueron expresados en concentraciones de malondialdehido ($\mu\text{g/g}$ de hígado) con ayuda de una curva de calibración obtenida previamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA); además se utilizaron intervalos confidenciales simultáneos para efectos de tratamientos.

RESULTADOS

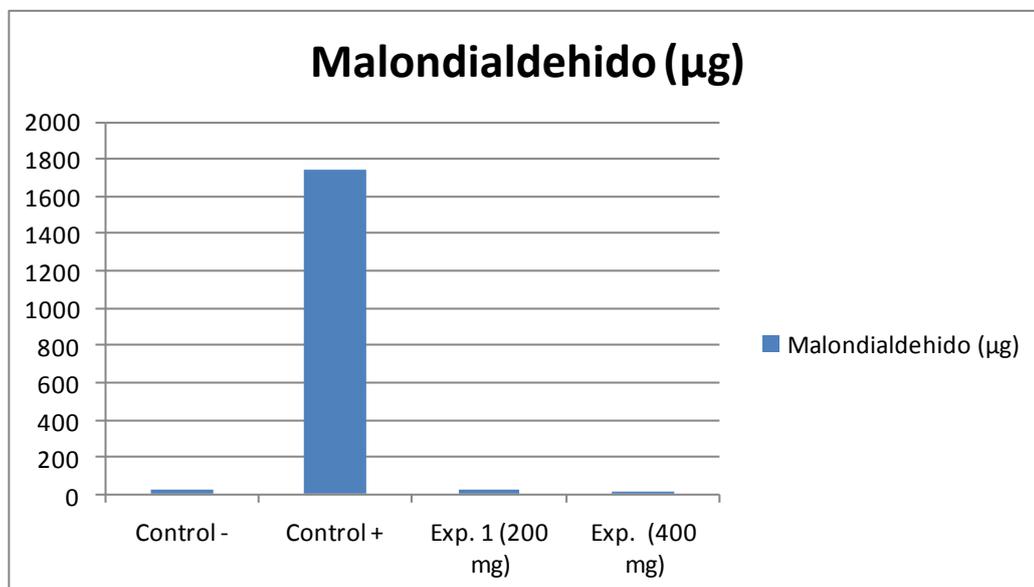


Fig. 1: Concentración de radicales libres en hígado de *R. rattus* var. albinus obtenidos en los 4 grupos. El grupo control negativo tratados con solución salina fisiológica estéril en un volumen del 3% del peso corporal, el grupo control positivo tratados con 1 ml de tetracloruro de carbono/ Kg de peso corporal; y un grupo experimental conformado por dos sub grupos, grupo experimental 1 tratados con 1 ml de tetracloruro de carbono/ Kg del peso corporal más 200 mg de extracto de "mangle" / Kg de peso corporal y grupo experimental 2 tratados con 1 ml de tetracloruro de carbono/ Kg del peso corporal más 400 mg de extracto de "mangle" / Kg de peso corporal.

Tabla 1. Resultados de ANOVA para malondialdehido según tratamientos utilizados en base al extracto de *R. mangle*

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	6.47811E6	3	2.15937E6	5.62	0.0161
Intra grupos	3.84223E6	10	384223.0		
Total (Corr.)	1.03203E7	13			

El F-ratio, que en este caso es igual a 5.62009, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el p-valor del test F es inferior a 0.05, hay diferencia estadísticamente significativa entre las Malondialdehido medias de un nivel de Tratamientos a otro para un nivel de confianza del 95.0%.

DISCUSIÓN

Varios estudios han demostrado que las plantas producen potentes antioxidantes y representan una importante fuente de antioxidantes naturales.

De los resultados, el gran incremento de radicales libres del grupo tratado con tetracloruro de carbono (CCl_4) hubo un gran incremento en las concentraciones de radicales libres, posiblemente se deba a que el tetracloruro de carbono por ser tóxico origina una gran formación de radicales

libres, esto comparado con los grupo control y experimental (GE1 y GE2) que muestran una disminución de radicales libres, lo cual se corrobora que el extracto hidroalcohólico de *R. mangle* muestra propiedades antioxidantes dado por la presencia de compuestos polifenólicos, los cuales son los principales responsables del incremento de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), así como la inhibición de la peroxidación lipídica (Shulka y col., 1999).

En este sentido existen reportes acerca de los efectos antioxidantes in vivo por extractos de plantas que contiene polifenoles o por compuestos polifenólicos puros. Así, un estudio revela que heridas cutáneas en ratas albinas tratadas por vía tópica con el extracto acuoso de hojas de la planta *Seabuckthorn* (*Hippophaea rhamnoides* L.) mostraron a los 7 días de tratamientos un incremento significativo en las actividades de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, mientras las concentraciones de MDA estaban disminuidas; a su vez también encontraron que este extracto aumento significativamente el proceso de curación (Gupta y col.; 2005). En otro estudio se informa que el tratamiento tópico de un extracto de polifenoles del te verde en la piel de ratones expuestos a radiación ultravioleta resultó en una significativa aumento de las enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa y catalasa, e inhibió la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas (Vayalil y col.; 2006). Un estudio reportó que el extracto de semillas de la uva, en el que se destaca la presencia de compuestos polifenólicos como: catequina, epicatequina, trans-resveratrol y ácido gálico, disminuyo la actividad mutagénica de la bleomicina en la cepa TA102 de *Salmonella typhimurium* (Stagos y col.; 2006). Empleando esta misma cepa como modelo de estudio, otros investigadores demostraron que el mecanismo que explica la actividad antimutagénica de los polifenoles es su capacidad secuestradora de radicales libres (Edenharder y Grunhage, 2003).

CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de *R. mangle* mostró un efecto hepatoprotector sobre la lipoperoxidación en hígado de *Rattus rattus* tanto a las concentraciones de 200 como a la de 400 mg/Kg de peso corporal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armenteros, M.** 1998. Evaluación de un desinfectante mamario post-ordeño de origen natural [Tesis doctoral]. La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de La Habana.
- Arroyo, A.** 1998. Actividad antiulcerosa de *Piper angustifolium* "matico". Tesis para optar el grado de Doctor. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina. Lima, Perú.
- Bulnes, C.; O. Fernández; D. Navarro; E. Marrero; D. Rueda & O. Figueroa et al.** 2001. Healing effect of a red mangrove extract in open aseptic wounds in rat. *Rev Salud Anim.* 23(2):102-8.
- Cáceres, A.; B. López; X. Juárez; J. del Aguila & S. García.** 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections 2: Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *J Ethnopharmacol.* 40:207-13.
- Chance, B. H. Sies & A. Boveris.** 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organism. *Physiol Rev.* 59:527-605.
- Child, R.; D. Wilkinson; J. Fallowfield & A. Donnelly.** 1998. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sport Exerc.* 30(11):1603-7.
- Edenharder, R. & D. Grunhage.** 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat Res.* 540(1):1-18.
- Gupta, A.; R. Kumar; K. Pal; P.K. Banerjee & R.C. Sawhney.** 2005. A Preclinical Study of the Effects of Seabuckthorn (*Hippophaea rhamnoides* L) Leaf Extract on Cutaneous Wound Healing in Albino Rats. *Lower Extremity Wounds.* 4(2):88-92.
- Kohen, R. & A. Nyska.** 2002. Oxidation of biological Systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic pathology.* 30(6): 620-50.
- Martínez, S.G.; H.G. Delgado & G.G. Garredo.** 2003. Mitos y realidades de la terapia antioxidante. *Vimang* nuevo natural antioxidante. La Habana. Edición especial del centro de química farmacéutica;p.67

- Marrero, E.; J. Sánchez; E. de Armas; A. Escobar; G. Melchor; M.J. Abad et al.** 2006. COX-2 and sPLA2 inhibitory activity of aqueous extract polyphenols of *Rhizophora mangle* (red mangrove). *Fitoterapia*. 77:313-5.
- Melchor, G.; M. Armenteros; O. Fernández; E. Linares & I. Fragas.** 2001. Antibacterial activity of *Rhizophora mangle* bark. *Fitoterapia*. 72: 689-91.
- Piña-Garza, E.** 1996. Los radicales libres: beneficios y problemas. *Gac Med Mex*. 132:183-200.
- Placencia, M.** 2001. Evaluación dermatológica de la *Buddleia globosa* "matico" en el tratamiento de ulcera gástrica inducida en animales de experimentación. Tesis para optar el grado de Magister. Universidad Nacional mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Roig, J.T.** 1988. Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. 2da ed. La Habana Editorial Científico-Técnica. p. 606-7.
- Rojas, N. & O. Coto.** 1978. Propiedades antimicrobianas de extractos de *Rhizophora mangle* L. *Rev Cubana Med Tropical*. 30(3):181-7.
- Rio, V.** 2000. Efecto antioxidante de *Allium cepa* y *Allium sativum* en la peroxidación lipídica inducida con Fe⁺³ / Ascorbato en cerebro aislado de *Rattus rattus* var. *Albinus*. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias mención Farmacología. Trujillo-Perú.
- Sánchez, L.M.; D. Rueda & B.C. Gómez.** 2001. Gastric antiulcer effect of *Rhizophora mangle* L. *J Ethnopharmacol*. 77:1-3.
- Shukla, A.; A.M. Rasik & B.N. Dhawan.** 1999. Asiaticoside induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. *Phytother Res*. 13 (1): 50-4.
- Stagos, D; G. Kazantzoglou; D. Theofanidou; G. Kakalopoulou; P. Magiatis; S. Mitaku et al.** 2006. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res*. 609(2):165-75.
- Vayalil, P.K.; C.A. Elmets & S.K. Katiyar.** 2006. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-Induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SHK-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*. 24(5): 0927-36.
- Vargas, F.; C. Rivas; A. Nursamaa & Z. Soltan.** 2007. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. 3-15.