

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**“EVALUACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES CRUDOS DE  
*Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) DE LA SELVA  
CENTRAL DEL PERÚ Y DETERMINACIÓN DE SU  
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA”**

**TESIS**

Para optar al Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y  
Terapéuticos

**AUTOR**

**Julia Esther Enciso Soria**

Lima – Perú

2013

## **DEDICATORIA**

*A la memoria de:*

***Dra. María Teresita Soria Ramírez***

*y*

***Dra. Clara Luz Vega Lette***

*Quienes me guiaron en todo momento, para alcanzar mis metas;  
gracias por vuestro ejemplo*

## AGRADECIMIENTOS

*A la **Dra. Arilmí Gorriti Gutiérrez**, asesora del presente trabajo, por sus consejos y orientación durante la ejecución del mismo.*

*Al **Dr. Jorge Arroyo Acevedo**, por la confianza depositada en mi persona y su valioso apoyo.*

# ÍNDICE

Página

## RESUMEN

## ABSTRACT

## ABREVIATURAS

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	01
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	02
<b>2.1. <i>Plukenetia volubilis</i> L. (sacha inchi)</b>	02
<b>2.1.1. Caracteres botánicos</b>	02
<b>2.1.2. Clasificación taxonómica</b>	03
<b>2.1.3. Hábitat y recolección</b>	04
<b>2.1.4. Composición química</b>	04
<b>2.1.5. Propiedades farmacológicas</b>	06
<b>2.1.6. Estudio toxicológico</b>	07
<b>2.2. Estrés oxidativo y enfermedades inflamatorias</b>	08
<b>2.3. El malondialdehído como marcador del estrés oxidativo</b>	11
<b>2.4. Óxido nítrico e inflamación</b>	13
<b>2.5. El estrés oxidativo y la membrana de glóbulos rojos</b>	15
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	17
<b>3.1. Reactivos y solventes</b>	17
<b>3.2. Equipos</b>	17
<b>3.3. Materiales</b>	18
<b>3.4. Unidades responsables de la Investigación</b>	18
<b>3.5. Diagrama de flujo</b>	18
<b>3.5.1. Colecta y clasificación botánica</b>	19

3.5.2.	Obtención de aceite crudo	19
3.5.3.	Análisis físico químico de aceites crudos	20
3.5.4.	Evaluación de ácidos grasos de los aceites crudos por Cromatografía de Gases	20
3.5.5.	Determinación de la actividad antiinflamatoria	21
3.3.5.1.	Actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> por el método del edema subplantar con carragenina de acuerdo a Winter <i>et al</i>	21
3.3.5.1.1.	Cuantificación del nivel de malondialdehído como marcador de estrés oxidativo	22
3.3.5.1.2.	Cuantificación del nivel de óxido nítrico	23
3.3.5.2.	Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> por estabilización de la membrana de glóbulos rojos	24
3.6.	Análisis estadístico	25
IV.	<b>RESULTADOS</b>	26
V.	<b>DISCUSIÓN</b>	38
VI.	<b>CONCLUSIONES</b>	46
VII.	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	47
VIII.	<b>ANEXOS</b>	52

## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
<b>Tabla N°1.</b>	Perfil de aminoácidos de proteínas de sachá inchi	06
<b>Tabla N°2.</b>	Marcadores directos del estrés oxidativo	11
<b>Tabla N°3.</b>	Lugares de colecta de sachá inchi y sus características	19
<b>Tabla N°4.</b>	Propiedades fisicoquímicas de los aceites de sachá inchi de las muestras M-1 a M-10 de los departamentos de Ucayali, Huánuco y Junín	27
<b>Tabla N°5.</b>	Ácidos grasos de los aceites crudos de sachá inchi de las muestras M-1 a M-10 de los departamentos de Ucayali, Huánuco y Junín	32
<b>Tabla N°6.</b>	Parámetros de inflamación según el método de edema subplantar en ratón	34
<b>Tabla N°7.</b>	Protección de membrana de glóbulos rojos según ensayo <i>in vitro</i>	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura N°1.</b>	<i>Plukenetia volubilis</i> L.(sachá inchi)	03
<b>Figura N°2.</b>	Esquema que muestra el efecto que producen los ROS sobre la peroxidación lipídica	12

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
<b>Gráfico N°1.</b> Niveles de colesterol, triglicéridos y HDL en mg/dL de los grupos experimentales	08
<b>Gráfico N°2.</b> Rendimientos de extracción de aceite crudo según el método de prensado	26
<b>Gráfico N°3.</b> Ácidos grasos libres de los aceites crudos de las diferentes muestras de sachá inchi	28
<b>Gráfico N°4.</b> Contenido de ácido oleico en las diferentes muestras de aceite crudo	31
<b>Gráfico N°5.</b> Contenido de ácido linoleico en las diferentes muestras de aceite crudo	31
<b>Gráfico N°6.</b> Contenido de ácido $\alpha$ -linolénico en las diferentes muestras de aceite crudo	33
<b>Gráfico N°7.</b> Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón	34
<b>Gráfico N°8.</b> Niveles de MDA en los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón	35
<b>Gráfico N°9.</b> Niveles de óxido nítrico en los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón	36
<b>Gráfico N°10.</b> Protección de membrana de glóbulos rojos según ensayo <i>in vitro</i>	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo N°1.</b> Certificación botánica de las semillas de <i>Plukenetia volubilis</i> L.	52
<b>Anexo N°2.</b> Reportes de evaluación de ácidos grasos por GC	53

## RESUMEN

Se realizó la determinación de los índices de yodo, saponificación, acidez y peróxido (AOAC) de aceites crudos de semillas comerciales de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) procedentes de los departamentos de Junín, Huánuco y Ucayali de la Selva Central y la evaluación de los ácidos grasos de los aceites crudos por cromatografía de gases, encontrándose que las muestras de sacha inchi del departamento de Junín presentaron los valores más altos de ácido alfa linolénico, omega -3 y los valores más bajos de ácido palmítico, esteárico y oleico; las muestras de sacha inchi del departamento de Huánuco presentaron los valores más altos de aceite crudo y ácido esteárico así con el menor porcentaje de humedad y las muestras del departamento de Ucayali presentaron los valores más altos de ácido oleico (ácido graso omega 9), ácido vacénico y ácido linoleico. El aceite de sacha inchi presenta actividad antiinflamatoria *in vivo* significativa por el método del edema subplantar en ratón con carragenina, la cual se evidencia en los valores obtenidos en la cuantificación del nivel de malondialdehído y óxido nítrico; no presenta actividad antiinflamatoria *in vitro* significativa por el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos., como se observa en la limitada protección de membrana de glóbulos rojos de rata.

**PALABRAS CLAVE:** *Plukenetia volubilis* L.; ácidos grasos; Sacha inchi; propiedades de aceites; cromatografía de gases, actividad antiinflamatoria.



## ABSTRACT

We performed the determination of iodine, saponification, acidity and peroxide index (AOAC) from commercial crude seeds of *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) from the departments of Junín, Huánuco and Ucayali that belong Amazonic jungle, and found that samples of sacha inchi by gas chromatography from Junín department presented the highest values of alpha linolenic acid, omega -3 and the lowest values of palmitic acid, stearic and oleic acids, and samples of sacha inchi from Huánuco department presented the highest values of crude oil and stearic acid and with less humidity and Ucayali samples showed higher values of oleic acid (acid omega 9), vaccenic acid and linoleic acid. Sacha inchi oil presents significant anti-inflammatory activity *in vivo*, by subplantar edema method in mice with carrageenan, which is evidenced by the values obtained by quantifying the level of malondialdehyde and nitric oxide and no significant antiinflammatory activity *in vitro*, by the method of stabilizing red blood cell membrane as seen in the limited protection of erythrocytes membrane of rat.

**KEYWORDS:** *Plukenetia volubilis* L.; fatty acids; Sacha inchi; oil properties; gas chromatography, antiinflammatory activity.

## ABREVIATURAS

<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organization.
<b>WHO</b>	: World Health Organization.
<b>FTIR</b>	: espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.
<b>1-H RMN</b>	: espectroscopia de resonancia magnético nuclear de protón.
<b>ONU</b>	: Organización de las Naciones Unidas.
<b>ALA</b>	: ácido alfa linolénico.
<b>PUFA(s)</b>	: ácidos grasos polinsaturados.
<b>EPA</b>	: ácido eicosapentaenoico.
<b>DPA</b>	: ácido docosapentaenoico.
<b>DL50</b>	: dosis letal media.
<b>HDL</b>	: lipoproteínas de alta densidad.
<b>ROS</b>	: reactive oxygen species/radicales libres de oxígeno.
<b>ATP</b>	: adenosin trifosfato.
<b>NADPH OXIDASA</b>	: nicotinamida adenina dinucleotido phosphata oxidasa.
<b>MDA</b>	: malondialdehido.
<b>ERO</b>	: especie reactiva de oxígeno.
<b>GMPc</b>	: guanosin monofosfato cíclico.
<b>NO</b>	: óxido nítrico.
<b>ADN</b>	: ácido desoxirribonucleico.
<b>AINES</b>	: antiinflamatorio no esteroideo.
<b>COX</b>	: ciclooxigenasa.
<b>FOE</b>	: fragilidad osmótica eritrocitaria.
<b>CG</b>	: cromatografía de gases.
<b>AOAC</b>	: Association of Oficial Analytical Chemists.
<b>QSAR</b>	: relaciones cuantitativas estructura-actividad.

## I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de las generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para restablecer la salud.

El Perú es uno de los países que posee mayor diversidad de flora, con alrededor de 25.000 especies únicas autóctonas, de las cuales cerca de 1.400 presentan propiedades medicinales.

Con el advenimiento de la medicina académica o científica, el sistema tradicional sigue teniendo presencia en más del 80% de la población de la selva peruana, con predominio en el área rural; son las comunidades quienes han utilizado tradicionalmente las plantas medicinales, para satisfacer sus necesidades básicas, acumulando prácticas ancestrales de selección, manejo y conservación de conocimientos que se transmiten de una generación a otra, siendo necesaria la investigación científica que valide su aplicación para coadyuvar a los organismos del Sector Salud en la implementación de normas respecto a su comercialización, manufactura y control de calidad.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo general realizar la determinación de los índices de yodo, saponificación, acidez y peróxido de aceites crudos de semillas comerciales de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) procedentes de los departamentos de Junín, Huánuco y Ucayali de la Selva Central así como evaluar los contenidos de omegas 3, 6 y 9. Se han identificado semillas comerciales de calidad aceptable, viables para su procesamiento en la industria, constituyendo un aporte sobre las propiedades del aceite crudo de sacha inchi, que contribuya indirectamente a mejorar socialmente la calidad de vida de los productores de sacha inchi. Así mismo, se evaluará la actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* de este aceite, planteándose como aporte a la prevención de procesos oxidativos e inflamatorios a través del consumo del aceite crudo de sacha inchi, un recurso de la biodiversidad peruana.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. *Plukenetia volubilis* L. (Sacha inchi)

Es una planta nativa de la Amazonía Peruana descrita por primera vez como especie, en el año 1753 por Linneo.

Se cultivó en la costa peruana desde la época prehispánica y se han encontrado semillas y representaciones de su fruto en cerámicas de las culturas Chimú y Mochica. Actualmente se estudia la presencia de esta planta en la milenaria cultura Caral, al norte de Lima, con más de 3000 años de antigüedad.

El Inca Garcilaso de la Vega, en Los Comentarios Reales de los Incas, hace alusión al inchic, nombre dado a esta especie: *“Hay otra fruta que nace debaxo de la tierra, que los indios llaman inchic y los españoles maní ( todos los nombres que los españoles ponen a las frutas y legumbres del Perú son del lenguaje de las islas Barlovento , que los han introducidos ya en su lengua española , y por eso damos cuenta de ellos), el inchic semeja mucho, en la médula y en el gusto, a las almendras; si se come crudo ofende a la cabeza, y si tostado, es sabroso y provechoso; con miel hacen de él buen turrón; también sacan del inchic muy lindo aceite para muchas enfermedades”*<sup>1</sup>

Las semillas de sachá inchi tienen un alto contenido de omega -3, omega -6, buen nivel de proteínas y aminoácidos esenciales según se muestra en la historia de uso y los ensayos científicos posteriores a su descubrimiento desde un aspecto meramente técnico, ya que las comunidades nativas poseedoras del conocimiento tradicional las utilizaron desde tiempos inmemoriales; que sobrepasa largamente la fecha de la primera mención científica en 1980.

#### 2.1.1 Caracteres botánicos

*Plukenetia volubilis* L., es una planta trepadora monoica, decidua; de hojas opuestas o simples, lámina foliar ovada-triangular de 6—13(—20) cm de largo y 4—10(—12) cm de ancho, con base truncada o cordada; el margen es crenado o finamente aserrado;

en la cara adaxial se presenta una protuberancia glandular en el ápice del pecíolo. <sup>2,3</sup>. Inflorescencia racemosa, alargada, monoica (bisexual) de 5—18 cm de largo; flores pistiladas solitarias en los nudos basales, columna estilar parcial o totalmente connada de 15—30 mm de largo, de flores masculinas subglobosas, numerosas y agrupadas en los nudos distales; con estambres de 16—30 con filamentos conspicuos, cónicos de 0,5 mm de largo. <sup>2,3</sup> Frutos en cápsulas tetra-, penta- o hexámeras, glabras de 2,5—6(—7) cm de diámetro de color verde que al madurar se tornan marrón oscuro; en las cápsulas se encuentran las semillas lenticulares, comprimidas lateralmente, de color marrón con manchas irregulares más oscuras de 1,5—2 x 0,7—0,8 cm, (figura 1). <sup>2-5</sup>



**Figura N°1** *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi)

### 2.1.2 Clasificación taxonómica

<i>Reino</i>	: <i>Vegetal</i>
<i>División</i>	: <i>Spermatophyta</i>
<i>Sub división</i>	: <i>Angiospermae</i>
<i>Clase</i>	: <i>Dicotiledónea</i>
<i>Orden</i>	: <i>Euphorbiales</i>

*Familia* : Euphorbiaceae  
*Género* : Plukenetia  
*Especie* : Plukenetia volubilis Linneo  
*Nombre común* : Sacha inchi, sachá inchi, sachá maní, maní del monte, maní del inca, inca peanut, duce, amauebe, amui-o (v. huitoto), sachá yachi, sachá yuchi, sachá yuchiqui, yuchi (v. cashibo), sampannakii, suwaa, Brack.<sup>5</sup>

\* Identificación taxonómica según McBride<sup>6</sup>, Mostacero et al.<sup>7</sup>

### 2.1.3 Hábitat y recolección

El área de distribución de *P. volubilis* L., se extiende desde las Antillas menores, Surinam y el sector noroeste de la cuenca amazónica en Venezuela y Colombia hasta Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil; <sup>2</sup> En Perú, *P. volubilis* L., se ha reportado en los departamentos de Amazonas, Cuzco, Huánuco, Junín, Loreto, Madre de Dios, San Martín y Ucayali.<sup>2,5</sup>

La especie con mayor relación a *P. volubilis* L. es *P. stipellata*, considerada también como un complejo de especies.<sup>4</sup> *P. stipellata* se diferencia sólo por la presencia de un par de estipulas pequeñas en el ápice del pecíolo, tamaño y forma del estilo y estambres; normalmente con cinco sépalos en lugar de seis, sin embargo *P. stipellata* se encuentra sólo en Centroamérica<sup>3</sup>. En el Perú, se reconocen además de *P. volubilis* L. cuatro especies: *P. polyandenia* Muell., *P. lorentensis* Ule, *P. brachybotrya* Muell y *P. huayllabambana* R.W. Bussmann recientemente descrita por Bussmann et al.<sup>8</sup>

### 2.1.4 Composición química

**Contenido de proteínas.-** *Plukenetia volubilis* L., en relación al contenido de proteínas presenta valores cercanos a la soya (28%), inferiores al algodón (33%), y superiores al maní (23%) y girasol (24%), (tabla 1); con respecto al contenido de aminoácidos, sachá

inchi presenta valores superiores de histidina, isoleucina, leucina, metionina+cisteína, fenilalanina+tirosina, treonina, triptófano y valina al comparar los valores de aminoácidos esenciales recomendados por la FAO/WHO para niños entre 2 y 5 años, y de todas las edades.<sup>9</sup> Mejía<sup>10</sup>, menciona valores de 24,21% y 25,86% en base húmeda y seca para las almendras de sachá inchi.

**Lípidos.-:** Las evaluaciones en sachá inchi, indican contenidos de aceite superior a las almendras de soya, maíz, maní, girasol, algodón, palma y oliva, alrededor del 54%. El análisis de ácidos grasos saturados e insaturados revelaron la presencia de ácido linoleico comparable al maní (36,8%) y ácido linolénico superior a las almendras de soya, maíz, maní, girasol, algodón y palma, alrededor del 48,61%.<sup>11</sup>

Al relacionar los mencionados valores con la semilla de linaza, los análisis de ácidos grasos por FTIR-<sup>1</sup>H RMN muestran menor contenido de ácido linolénico (47,4-53,3%) que la semilla de linaza (54,1-58,3%); mayor contenido de ácido linoleico (33,7-39,3%) que la linaza (14,2-18,9%) y menor contenido de ácido oleico (6,1-8,9%) con respecto a la linaza (17,1- 21,7%).<sup>14</sup> Investigaciones han revelado que el contenido de ácido oleico (9,6%) es inferior a los aceites de soya, maní, algodón y girasol.<sup>9</sup>

**Carbohidratos y fibra.-:** Respecto al contenido de carbohidratos y fibra cruda, Mejía<sup>10</sup>, describe la caracterización del aceite de sachá inchi menciona valores de 4,03 y 4,30% en base húmeda y seca para carbohidratos de almendras, y para la fibra cruda de 11,30 y 12,07% en base húmeda y seca. En el caso de los residuos industriales de la extracción de sachá inchi, Mondragón<sup>15</sup>, menciona valores de 20,84 para los carbohidratos en base húmeda y seca, y para la fibra cruda, valores de 3,00%+-1,03 y 3,16% +- 1.08 para base húmeda y seca.

**Tabla N°1.** Perfil de aminoácidos de proteínas de sachá inchi

Aminoácidos (mg/g proteína)	Sachá inchi	Soya	Maní	Algodón	Girasol	FAO/WHO/ONU
Proteína (%)	27	28	23	33	24	
Esenciales						
<i>Histidina</i>	26	25	24	27	23	19
<i>Isoleucina</i>	50	45	34	33	43	28
<i>Leucina</i>	64	78	64	59	64	66
<i>Lisina</i>	43	64	35	44	36	58
<i>Metionina</i>	12	13	12	13	19	...
<i>Cisterna</i>	25	13	13	16	15	...
<i>Metionina+cisteína</i>	37	26	25	29	34	25
<i>Fenilalanina</i>	24	49	50	52	45	...
<i>Tirosina</i>	55	31	39	29	19	...
<i>Fenilalanina+tirosina</i>	79	80	89	81	64	63
<i>Treonina</i>	43	39	26	33	37	34
<i>Triptófano</i>	29	13	10	13	14	11
<i>Valina</i>	40	48	42	46	51	35
No esenciales						
<i>Alanita</i>	36	43	39	41	42	...
<i>Arginina</i>	55	72	112	112	80	...
<i>Asparagina</i>	111	117	114	94	93	...
<i>Glu</i>	133	187	183	200	218	...
<i>Glicina</i>	118	42	56	42	54	...
<i>Prolina</i>	48	55	44	38	45	...
<i>Serina</i>	64	51	48	44	43	...
TEAA	411	418	349	365	366	...
TAA	976	985	945	936	941	...
TEAA/TAA (%)	42	42	37	39	39	...

Fuente: Hamaker *et al.* (1992). Los valores de proteína de soya, maní, algodón y girasol, según Hamaker *et al.*<sup>9</sup>, se tomaron de Bodwell y Hopkins<sup>12</sup>. FAO/WHO/ONU: Recomendado para niños de 2-5 años, y todas las edades, excepto infantes (Join FAO/WHO Expert Consultation, 1990)<sup>13</sup>. TEAA: Total de aminoácidos esenciales. TAA: Total de aminoácidos.

### 2.1.5 Propiedades farmacológicas

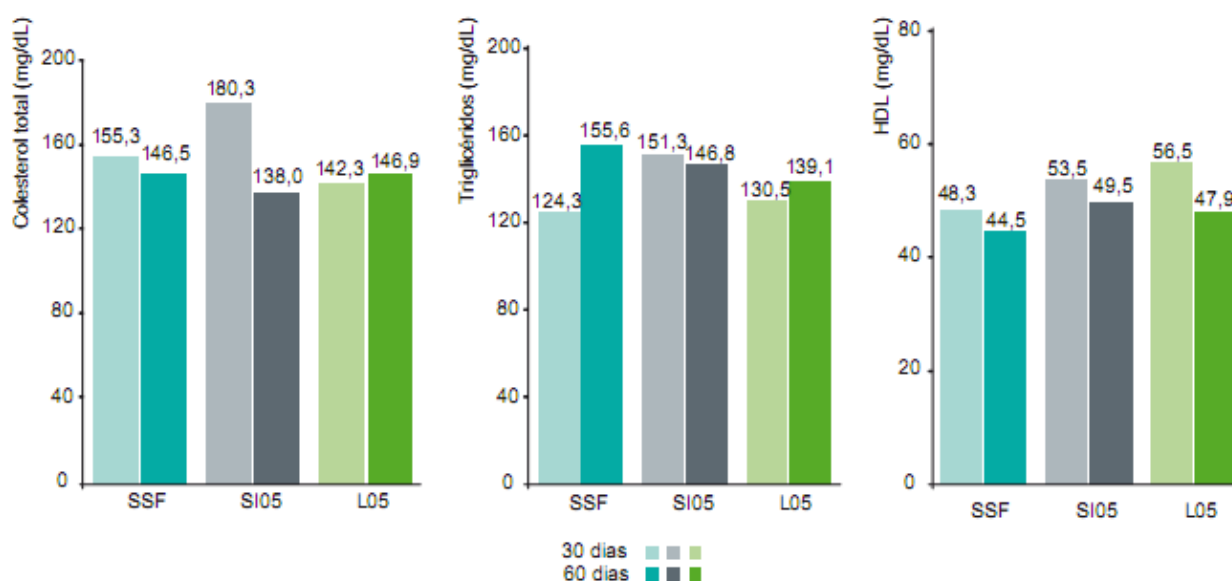
El ácido alfa-linolénico (ALA), y el ácido linoleico (C18:2, omega-6), son dos ácidos grasos esenciales en el ser humano, cuyo consumo imprescindible debe realizarse a través de la dieta porque el organismo no puede sintetizarlos. Son importantes por ser precursores para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) con mayor número de carbonos.<sup>16</sup> Investigaciones



realizadas por Harper *et al.*<sup>17</sup>, respecto al incremento a nivel plasmático de la concentración de ácidos grasos protectores del corazón en el ser humano (omega-3). En un ensayo clínico sobre una población predominantemente afro-americana con dolores crónicos; con incrementos significativos del 60 y 25% de ácido eicosapentaenoico (EPA, omega-3) y ácido docosapentaenoico (DPA), se demostró que consumiendo 3 g de ALA/día a través de cápsulas con aceite de linaza durante 12 semanas, se concluyó que el ácido alfa-linolénico (ALA), constituye una alternativa de consumo al aceite de pescado. Los daños cardiovasculares son la principal causa de muerte en muchos países desarrollados, donde existen limitadas posibilidades de consumir ácidos grasos esenciales con omega-3 de origen animal, por lo que las alternativas de consumo de aceites de origen vegetal con ácido alfa linolénico resultan indispensables. Baylin *et al.*<sup>18</sup>, en su estudio clínico sobre el empleo de ALA en tejido adiposo como biomarcador asociado a riesgos cardiovasculares, concluyeron que existe relación inversa entre el consumo de ALA y el infarto al miocardio, sugiriendo que la ingesta de aceites ricos en ALA confiere protección importante contra daños cardiovasculares.

#### **2.1.6 Estudio toxicológico**

En relación al aceite de sachá inchi (*P. volubilis L.*), Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, evaluaron la toxicidad oral a 60 días del aceite de sachá inchi y linaza y determinaron su DL50 en roedores. Los resultados de la investigación indican que los aceites crudos de sachá inchi y linaza no presentan toxicidad hacia los 60 días de consumo, produciendo un efecto beneficioso sobre los niveles de colesterol total, triglicéridos y HDL con respecto al grupo control, asimismo la DL50 para ambos aceites se encontró por encima de los 37 g/kg de animal (gráfico 1).



**Gráfico N°1.** Niveles de colesterol, triglicéridos y HDL en mg/dL de los grupos experimentales. SSF: solución salina de suero fisiológico; SI05: aceite de sacha inchi 0,5 mL; L05: aceite de linaza 0,5 mL. Cada barra representa los valores promedio de ocho animales, Gorriti *et al.* <sup>19</sup>.

Gogus y Smith <sup>20</sup>, en una revisión del conocimiento actual de los ácidos grasos omega-3, indican que los PUFAs omega-3 se emplean en el tratamiento de daños inflamatorios intestinales, eczemas, psoriasis y artritis reumatoidea; así como en el tratamiento de la enfermedad de Crohn, debido a que al incrementarse los PUFAs en omega-6 y decrecer los PUFAs omega-3, se eleva la proporción de ocurrencia de inflamaciones a nivel de colon, por lo tanto los PUFAs con omega-3 pueden también reducir los daños a nivel de mucosa y la inflamación.

## 2.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES INFLAMATORIAS

El estrés oxidativo se define como la pérdida de equilibrio entre la generación de oxidantes y la actividad antioxidante a favor de los oxidantes o también como el efecto nocivo que se produce en el organismo cuando hay un aumento de degradación de los hidratos de carbono, grasas y proteínas provocados por radicales libres. Los sistemas antioxidantes pueden ser endógenos y exógenos, los cuales limitan la actividad y producción de los radicales libres de oxígeno (ROS) manteniendo el sistema bajo control. Los antioxidantes endógenos más

importantes son: las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutathion peroxidasa. El sistema de glutathion como antioxidante está formado por el glutathion reducido y por la actividad de la enzima glutathion reductasa que reduce el glutathion oxidado; la transferrina y la ceruloplasmina se consideran proteínas antioxidantes. Los sistemas antioxidantes exógenos más significativos son: las vitaminas A, C, E y algunos metales como el cobre y el selenio, éste último actúa como cofactor de la enzima glutathion peroxidasa.<sup>21</sup>

Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas del oxígeno, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se destruya. La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa.

Algunas de las especies menos reactivas (como el superóxido) pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición en quinonas, especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular. Las quinonas pueden realizar un ciclo redox con sus conjugados semiquinonas e hidroquinonas, en algunos casos, catalizando la producción de superóxido desde peróxido de hidrógeno. El estrés oxidativo generado por el agente reductor ácido úrico puede estar implicado en el síndrome de Lesch- Nyhan, accidentes cerebrovasculares y el síndrome metabólico. Del mismo modo la producción de especies reactivas del oxígeno en presencia de homocisteína en homocisteinuria, así como arteriosclerosis, accidentes cerebrovasculares, y Alzheimer. Metales tales como hierro, cobre, cromo, vanadio y cobalto son capaces de formar ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción

cataliza reacciones que producen radicales y pueden producir ROS. Las reacciones más importantes son probablemente la reacción de Fenton y la reacción de Haber-Weiss, en la que se producen radicales hidroxilo de la reducción del hierro y peróxido de hidrógeno.

Otras enzimas capaces de producir superóxido son la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. El peróxido de hidrógeno es producido por una amplia variedad de enzimas monooxigenasas y oxidasas.<sup>22</sup>

En el ser humano, el estrés oxidativo está involucrado en muchas enfermedades, como la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson, encefalopatía miálgica, sensibilidad química múltiple, la enfermedad de Alzheimer que también es importante señalar en el envejecimiento. Los radicales hidroxilo pueden dar lugar a modificaciones de los aminoácidos (e.g. la formación de meta-tirosina y orto-tirosina a partir de fenilalanina), hidratos de carbono, iniciar la peroxidación de lípidos, y oxidar nucleobases. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno pueden resultar beneficiosas ya que son utilizadas por el sistema inmunitario como un medio para atacar y destruir a los patógenos, a través de la fagocitosis. También son utilizadas en la señalización celular, denominada señalización redox.

Este desequilibrio y predominio de los radicales libres se debe a múltiples causas: las endógenas (producidas por el propio organismo en su funcionamiento) tales como la respiración mitocondrial; la activación de polimorfonucleares; el metabolismo de ácido araquidónico; las acciones enzimáticas, entre otros. Otras causas, las exógenas, se deben a factores externos: contaminación ambiental; obesidad, sedentarismo, hábitos tóxicos; estrés prolongado; desconocimiento nutricional; exposición indebida al sol o a diversas enfermedades como la diabetes, artritis, enfermedad de Crohn's, SIDA o daños sobre el sistema nervioso central, cáncer, hepatitis A, B y C; insuficiencia renal crónica, asma, enfermedades cardiovasculares y daño por isquemia-reperfusión. Se ha demostrado científicamente que la presencia de este tipo de estrés oxidativo es causa o consecuencia de más de 250 enfermedades.

Para valorar el estrés oxidativo existen medidores directos e indirectos, como se observa en la siguiente tabla, a pesar de que los radicales libres son difíciles de medir por su reactividad. (Tabla 2)

**Tabla N°2. Marcadores directos del estrés oxidativo.**

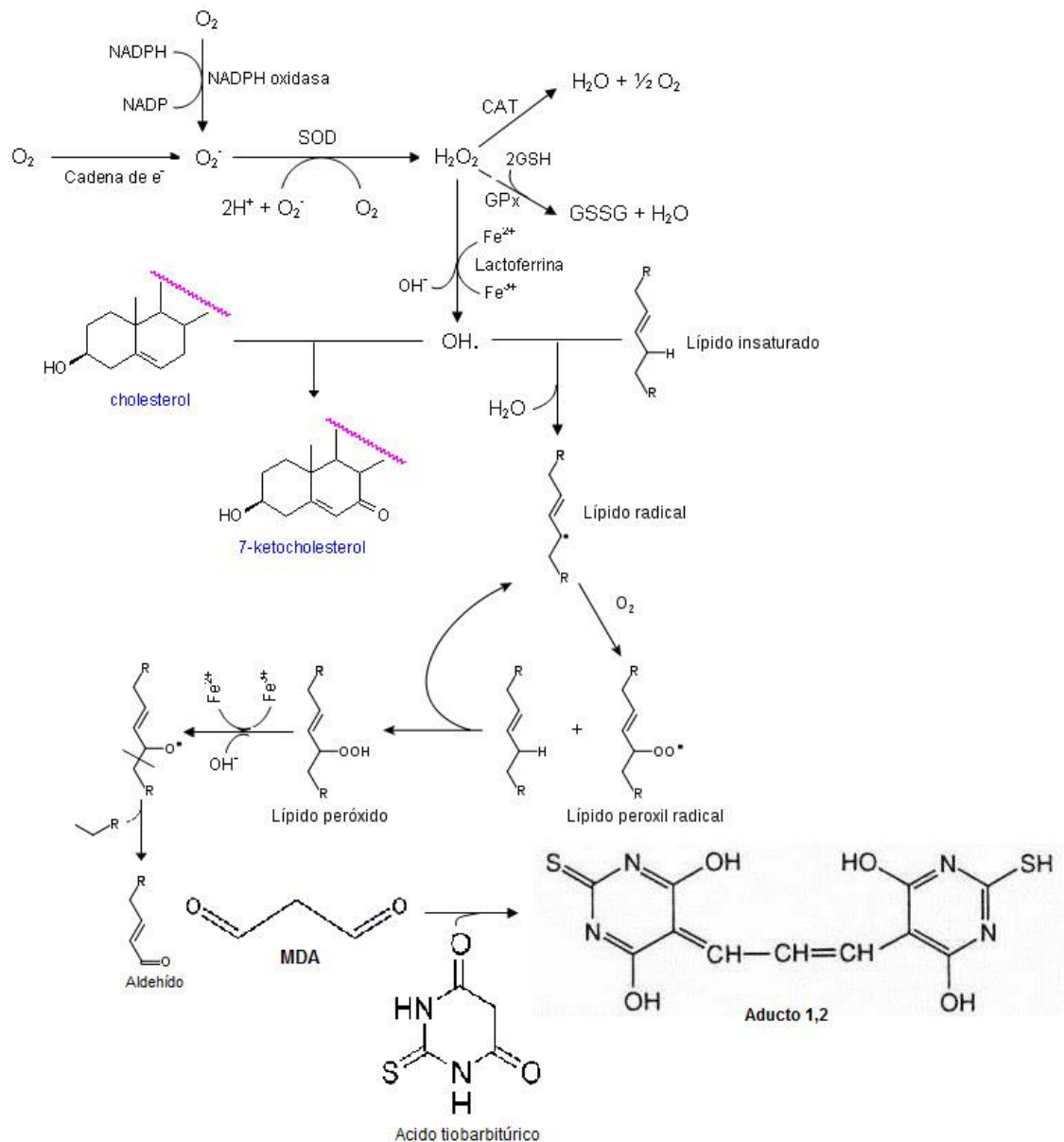
Lípidos	<i>Malondialdehído</i>
Ácidos nucleicos	<i>8-oxo-deoxiguanosina</i>
Proteínas	<i>Orto-tirosina Meta-tirosina Dinitro-tirosina</i>

Fuente: Giménez A. Púrpura de Schölein-Henoch y estrés oxidativo. Tesis para optar el grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Facultad de Medicina, Dpto. de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Radiología, Medicina Física. Universidad de Barcelona. España, 2004.<sup>22</sup>

Es conocida la relación existente entre las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (que provocan estrés oxidativo) con las enfermedades inflamatorias; por lo que extractos de plantas que presentan sustancias como flavonoides, polifenoles y otros compuestos con capacidad antioxidante, en muchas ocasiones a su vez presentan efecto antiinflamatorio.

### **2.3. EL MALONDIALDEHIDO COMO MARCADOR DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

En la lipoperoxidación de tejidos animales, los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando **Malondialdehído (MDA)**, de tal manera que la concentración sérica de MDA, es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y por lo tanto un buen indicador de peroxidación lipídica.



**Figura Nº 2.** Esquema que muestra el efecto que producen los ROS sobre la peroxidación lipídica.

Fuente: Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas - UNR - Rosario – Argentina laboratorio@biologiaosea.com.ar www.biologiaosea.com.ar Estrés Oxidativo 2006 - 2009<sup>22</sup>

El MDA se considera un aldehído tóxico que propagaría la cadena de peroxidación. Un incremento del estrés oxidativo puede estar producido por tres condicionantes:

- Aumento mantenido de los radicales libres de oxígeno o de nitrógeno que superarían los mecanismos de defensa.
- Disminución de la defensa antioxidante.
- Acción conjunta de ambos mecanismos que provocaría un daño oxidativo crónico.

La determinación se basa en la reacción colorimétrica de peróxidos lipídicos con TBA (ácido tiobarbitúrico) para dar malondialdehído (MDA) a una determinada longitud de onda.

#### **2.4. ÓXIDO NÍTRICO E INFLAMACIÓN**

El óxido nítrico (NO), considerado como un radical libre inestable; juega un importante papel en la regulación de la peroxidación lipídica inducida por los ERO (O<sub>2</sub>·-, OH·, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el radical peróxilo). El NO en algunos casos estimula la oxidación lipídica y en otros actúa como mediador de las reacciones que protegen las membranas de la oxidación, al inhibir la peroxidación lipídica inducida por el superóxido y peroxinitrito. El NO promueve la oxidación cuando su tasa de síntesis es menor o equivalente a la tasa de síntesis del ión radical superóxido; por el contrario cuando su tasa de síntesis es mayor a la del superóxido inhibe la peroxidación lipídica y por lo tanto la formación de MDA. Esta última reacción requiere una síntesis elevada de NO. El NO puede actuar de forma similar a la Vit E, como un posible inhibidor de las reacciones de propagación de radicales libres a través de una reacción radical-radical con especies citotóxicas como los radicales alcóxilo y peróxilo.

La participación de NO en la respuesta inflamatoria ha sido demostrada en modelos animales y en enfermedades inflamatorias humanas <sup>23</sup> Se sabe que el NO producido en bajas cantidades por la acción de la eNOS tiene un papel fisiológico, con el GMPc como segundo mensajero; por otra parte, muchas respuestas patológicas agudas y crónicas se asocian a un exceso en la producción de NO catalizada por la iNOS e iniciada por citocinas y endotoxinas en diversos tipos de las células, especialmente en macrófagos. También las isoformas constitutivas de la NOS pueden activarse en respuesta a estímulos inflamatorios y de este modo participar en la reacción inflamatoria, tal y como ha sido descrito para la nNOS en ciertos modelos de inflamación neurogénica. Aunque el NO participa en las fases vasculares y celulares de la respuesta inflamatoria, la modulación ejercida por este mediador puede depender

del tipo de lecho vascular implicado en la reacción y de la interacción con otros múltiples mediadores.

El posible papel del NO en funciones inflamatorias podría ejercerse a varios niveles:

- a) Inicialmente, por su capacidad de producir vasodilatación, alteración de la permeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas;
- b) En una fase más tardía o crónica de la inflamación, la señal inflamatoria puede magnificarse mediante la producción de moléculas como el factor transcripcional NF- $\kappa$ B, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) y el interferón  $\gamma$  ( $\gamma$ -IFN); estos, promoverían la transcripción de la iNOS, generándose grandes cantidades de NO, mayor vasodilatación y edema; este NO puede sufrir procesos de transformación a productos altamente reactivos capaces de inducir daño por diversos mecanismos, siendo uno de los más importantes, el daño de la doble hélice del ADN, con la consecuente muerte celular

El papel del NO también ha sido evaluado en modelos clásicos de inflamación, como el edema de la pata por inyección de carragenina, donde se obtuvieron niveles elevados de nitritos y de iNOS, 6 horas después de la administración de la carragenina. Los autores concluyeron que el NO formado por acción de la cNOS desempeñaría un papel importante para iniciar esta respuesta, mientras que la iNOS mantendría la inflamación más tardía y sostenida. La administración sistémica del L-NAME o del L-NMMA (inhibidores no selectivos de la NOS) reduce las fases tempranas y tardías del edema. En contraste, la administración de inhibidores más selectivos de los iNOS, como la L-NIL y la aminoguanidina, inhibe solamente la fase tardía del edema, así como la migración de neutrófilos y la elevación de los niveles de nitritos y de PGE<sub>2</sub> en la pata inflamada. Otros estudios también han concluido que la inhibición farmacológica de iNOS no produce la eficacia antiinflamatoria prevista, probablemente debido al gran número de otros factores involucrados en la respuesta inflamatoria.



Hoy en día se sabe que los fármacos esteroideos con actividad antiinflamatoria inhiben la síntesis de la iNOS. Otras drogas antiinflamatorias también inhibirían la inducción de los iNOS, incluyendo las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) o los productos nuevos que demuestran efectos antiinflamatorios en modelos experimentales, como los derivados de chalcona, capaces de inhibir la síntesis *de novo* de la iNOS o un derivado nuevo del ditriazine, también capaz de inhibir la inducción de la COX.

Estos resultados no concluyentes y a veces contradictorios, destacan la necesidad de mayor investigación en esta área; de allí la importancia de disponer de modelos animales válidos que permitan estudiar los mecanismos desencadenantes, los neurotransmisores y los mediadores involucrados en el proceso inflamatorio, así como la secuencia de eventos que lo acompañan.

## **2.5. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA MEMBRANA DE GLÓBULOS ROJOS**

La membrana celular constituye una interfase entre el compartimento intra y extracelular que permite el libre recambio de moléculas de agua, estableciéndose un gradiente osmótico. Cuando la célula enfrenta un ambiente hipotónico se genera un movimiento neto de agua libre hacia su interior. Según el grado de hipotonicidad y la capacidad de la membrana para mantener su integridad, la célula se hincha y estalla permitiendo, en el caso de los eritrocitos, la salida de hemoglobina. Esta propiedad es utilizada en la prueba de la fragilidad osmótica eritrocitaria (FOE), que consiste en exponer alícuotas de eritrocitos a concentraciones decrecientes de cloruro de sodio (NaCl), usualmente entre 0,85% y 0%, y luego cuantificar el grado de hemólisis en cada una de ellas. Por lo tanto, la FOE permite evaluar la resistencia y estabilidad de la membrana del eritrocito frente a un estrés osmótico.

La peroxidación de proteínas y lípidos, causada por la excesiva exposición a prooxidantes, conduce a cambios degenerativos en la hemoglobina y modifica, además, la arquitectura de la membrana celular.

Desde el punto de vista funcional, el daño oxidativo de la membrana altera la fluidez, permeabilidad y función metabólica, resultando un incremento en la fragilidad de la membrana del eritrocito.

Los eritrocitos de mamíferos son particularmente susceptibles a sufrir daño oxidativo debido a que sus lípidos de membrana son lábiles a la oxidación, por lo tanto los glóbulos rojos se constituyen en un buen modelo experimental para el estudio de los mecanismos de lesión por parte de los radicales libres y determinar el potencial antioxidante de diversos compuestos<sup>24</sup>

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Reactivos y solventes

Los reactivos y solventes utilizados fueron de grado analítico Sigma Aldrich Chemical Co. y Merck.

#### 3.2. Equipos

- *Prensa hidráulica, marca Nacional, 220 v.*
- *Balanza analítica marca Heraeus  $\pm 0,0001$ , 220 v.*
- *Espectrofotómetro Spectronic 20, 110 v.*
- *Estufa marca Memmert, 220 v.*
- *Bomba de vacío, marca Copelametic, 220 v.*
- *Equipo de baño maría, marca Nacional, 220 v.*
- *Refrigeradora marca Singer, 220 v.*
- *Congeladora, marca Mabe, 220 v.*
- *Molino de cuchillas marca Wiley, 220 v.*
- *Refractómetro Abbe, marca Carl Zeiss*
- *Baño maría marca Barnstead Thermolyne, 230 v.*
- *Balanza analítica marca Sartorius  $\pm 0,0001$ , 220 v.*
- *Vortex marca Barnstead Thermolyne, 230 v.*
- *Cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de flama de hidrógeno (FID). Marca: Perkin Elmer Autosystem XL.*
- *Columna capilar Supelcowax – 10 de silica fundida marca Supelco de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu$ m de espesor de película.*
- *Densitómetro DM40 Density Meter, marca Mettler Toledo, USA*
- *Refractómetro RM40 Refractometer, marca Mettler Toledo, USA.*

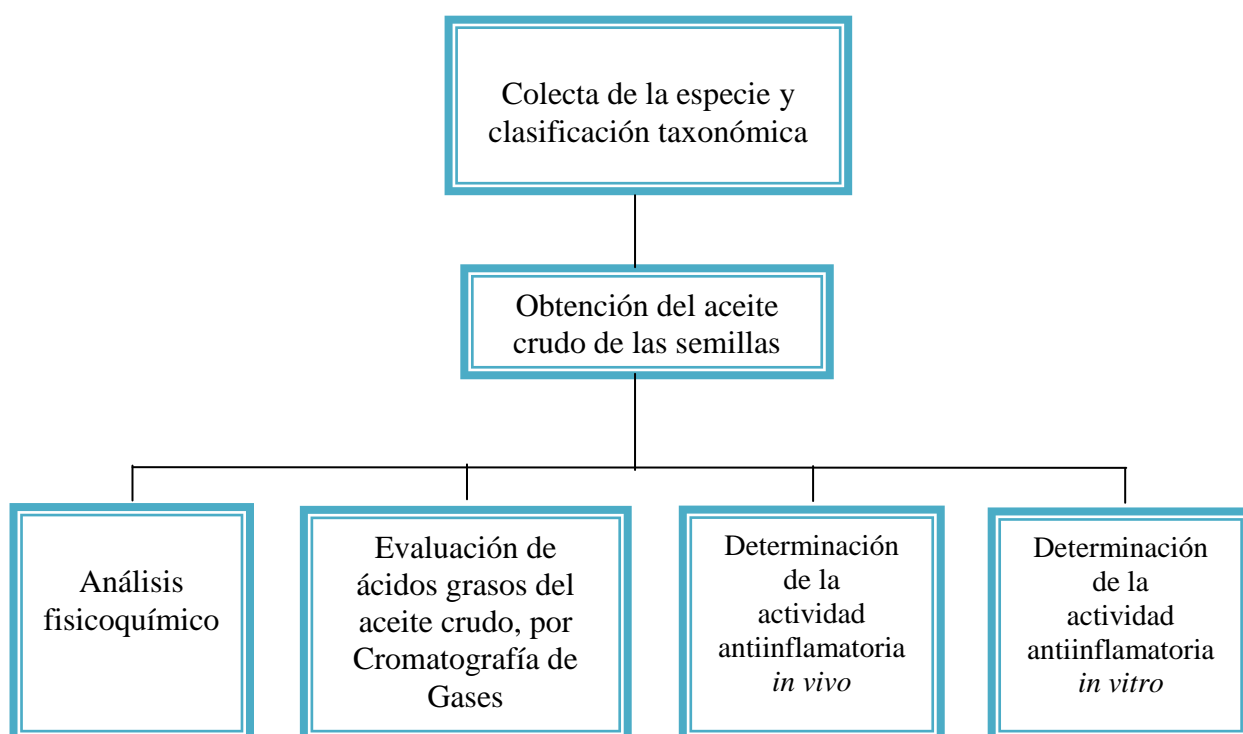
### 3.3. Materiales

- *Equipos soxhlet de 250 mL de capacidad.*
- *Desecadores.*
- *Cronómetro.*

### 3.4. Unidades responsables de la investigación

Las actividades de investigación se realizaron en el Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; eventualmente se realizaron labores de prensado en la planta piloto de la Empresa Agronegocios Peruagro S.R.L. Los análisis de ácidos grasos se realizaron en los laboratorios de “Análisis fisicoquímico y análisis de CG del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú”. Los análisis de índice de refracción y densidad se realizaron en el Laboratorio Control de calidad de la Empresa Esencias y Fragancias. Los ensayos de determinación de la actividad antiinflamatoria se realizaron en el Bioterio y Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM.

### 3.5. Diagrama de flujo



### 3.5.1 Colecta y clasificación taxonómica

Para la realización de la investigación, se recolectaron semillas de sachá inchi de productores y acopiadores de los departamentos de Ucayali, Huánuco y Junín de la Selva Central, entre los meses de enero del año 2011 y febrero del año 2012 (Tabla 3). La clasificación taxonómica la realizó un biólogo colegiado inscrito en el Registro de profesionales que realizan certificaciones e identificaciones de especímenes y productos de flora y fauna silvestre con aprobación del Ministerio de Agricultura (Anexo 1).

**Tabla Nº 3.** Lugares de colecta de Sachá inchi y sus características

Lugar de colecta	HUÁNUCO Leoncio Prado Luyando	UCAYALI Coronel Portillo Campoverde	JUNÍN Satipo Río Negro
Coordenadas	75°59'30"W	75°20'58"W 08°47'52" S	74° 41 15" W 11° 12 34" S
Clima	Tropical, húmedo, cálido	Tropical, húmedo, lluvioso	Húmedo, cálido
Precipitación (mm/año)	2040	2344	2000
Temperatura promedio (°C)	24,9°	26,0°	25,4°
Altitud (msnm)	646	200	632
pH del suelo	3,8	4,0-5,0	5,5

### 3.5.2 Obtención de aceite crudo

Doscientos (200) g de almendras, convenientemente seleccionadas se colocaron en el cilindro de acero inoxidable de la prensa hidráulica (Marca NACIONAL) y se procedieron a prensar hasta alcanzar la presión de 3000 PSI. Los aceites crudos obtenidos se decantaron y posteriormente se filtraron a través de papel filtro (Whatman No. 1) con la ayuda de una bomba de vacío

(Copelametic, USA); los volúmenes filtrados se almacenaron a temperatura controlada (menor a 25°C) en frascos de color ámbar.<sup>25</sup>

### **3.5.3 Análisis físico químico de aceites crudos**

Los aceites crudos se evaluaron según los siguientes métodos: humedad método AOAC <sup>26</sup> (1990, 984.20), índice de acidez método AOAC <sup>26</sup> (1990, 940.28), índice de yodo método AOAC <sup>26</sup> (1990, 920.159), índice de peróxido método AOAC <sup>26</sup> (1990, 965.33), densidad en el densitómetro (Mettler Toledo Modelo Densito 30P, USA), índice de refracción en el refractómetro (Mettler Toledo Modelo 30PX, USA).

### **3.5.4 Evaluación de ácidos grasos de los aceites crudos por Cromatografía de Gases**

Los aceites fueron convertidos a sus correspondientes ésteres de metilo por reacción con las soluciones NaOH 2N y HCl 2N en metanol. Los ácidos grasos metilados, se inyectan al cromatógrafo de gases donde se separan en la fase estacionaria de la columna según sus características, al ser arrastrados por la fase móvil (hidrógeno), de acuerdo al método validado por el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, LABS-ITP-FQ-002-98.<sup>27</sup>

Procedimiento:

- En un tubo de ensayo se colocó aproximadamente 50 mg de aceite previamente homogenizada.
- Se agregó aproximadamente 2,5 mL de éter de petróleo y agitó en vortex hasta disolver.
- Se agregó 0,25 mL de NaOH 2N en metanol y se agitó vigorosamente en vortex por 10 segundos.
- Se sumergió en baño maría a aproximadamente 50 ° C durante 20 segundos, agitándose 10 segundos en vortex.
- Se agregó 0,30 mL de HCl 2N en metanol. Agitar y luego esperar hasta que se separen las dos fases.

- Se separó la fase del éter de petróleo que contiene los ácidos grasos metilados, con ayuda de una pipeta, y se introduce en un vial de vidrio.
- Se colocó el vial en el Autosampler del cromatógrafo de gases y programar el equipo.
- Las condiciones de análisis fueron:
 

Temperatura del horno	230 ° C
Temperatura del inyector	250 ° C
Temperatura del detector	270 ° C
Presión del hidrógeno	5 psi
Split	100 : 1
- Tiempo de análisis: 65 minutos.

#### Cálculos

La cuantificación de los ácidos grasos metilados se realizó mediante el software del equipo, y se reporta como porcentaje relativo. Los resultados proporcionados por el equipo (duplicado) se promedian.

Se verificaron los tiempos de retención de cada uno de los ácidos grasos, analizando paralelamente un estándar de ácidos grasos cada vez que se realice un nuevo análisis.

### 3.5.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria

Considerando la disponibilidad de la semilla, facilidad para su recolección y características del aceite, se utilizó la muestra M-10 del departamento de Junín, para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* del aceite de sachá inchi.

#### 3.5.5.1 Actividad antiinflamatoria *in vivo* por el método del edema subplantar con carragenina de acuerdo a Winter *et al.*<sup>28</sup>.

Este método se modificó al utilizar animales machos, y al realizar la medición de la inflamación realizada con micrómetro.

Procedimiento:

Treinta (30) ratones del Instituto Nacional de Salud, con peso promedio de  $25 \pm 3$  g de peso corporal, se distribuyeron en grupos de cinco animales por grupo. Antes del ensayo los animales estuvieron 72 horas en ambientación en el lugar de trabajo, con agua y alimento a libertad, luz:oscuridad (12:12 horas). Previa medida basal, se administró 0,05 mL de suspensión de carragenina lambda (Sigma) al 2% en la aponeurosis de la pata izquierda del ratón y luego se administraron los tratamientos: Normal + SSF 5 mL/kg; Carragenina (C); C + Sacha inchi 50 mg/kg; C + Sacha inchi 500 mg/kg; C + Sacha inchi 1000 mg/kg; dos horas después se volvió a medir el edema subplantar, utilizando un micrómetro. El edema fue expresado en mm.

#### **3.5.5.1.1. Cuantificación del nivel de malondialdehído como marcador de estrés oxidativo**

El marcador de estrés oxidativo se determinó en suero procedente de la sangre extraída de ratones inducidos con inflamación subplantar por carragenina de acuerdo a Arroyo *et al.*<sup>29</sup>, Suarez<sup>30</sup> y Buege *et al.*<sup>31</sup> Se empleó la prueba de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que en forma general mide la formación de malondialdehído u otros carbonilos procedentes de la conversión oxidativa de lípidos y otras moléculas como proteínas.

Los resultados fueron informados como formación del complejo malondialdehído ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA), complejo coloreado que se mide a 535 nm. Se usó el coeficiente de extinción molar de MDA-TBA ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).



### 3.5.5.1.2. Cuantificación del nivel de óxido nítrico

La determinación de los niveles de óxido nítrico se realizó según Miranda *et al.*<sup>32</sup> y Arroyo *et al.*<sup>29</sup>, para esto se recolectó la sangre de los animales en estudio mediante punción cardiaca, bajo anestesia con éter y jeringa heparinizada. Se procedió a centrifugar la sangre durante 15 minutos, a 3500 rpm, para separar los elementos formes del plasma. Se extrajo el plasma mediante micropipetas, sin tomar la parte precipitada y se depositó en eppendorf de 1,5 mL, enumerados correlativamente. La desproteínización del plasma en medio alcalino se realizó por adición de sustancias en la siguiente proporción: plasma 0,8 mL, H<sub>2</sub>O destilada 0,6 mL, NaOH 1M 0,1 mL y ZnSO<sub>4</sub> al 30% 0,1 mL. Entre la adición de la sustancia alcalina NaOH y la sustancia atrapadora de proteínas ZnSO<sub>4</sub>, hubo un intervalo de 5 minutos; posteriormente, se ejerció agitación constante por 10 minutos, obteniéndose una solución lechosa. Se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 3500 rpm y se separó el plasma desproteínizado (incluido los controles) en una nueva batería de eppendorf. A la nueva solución se le adicionó reactivo de Griess A; 5 minutos después, reactivo de Griess B; se dejó reposar por 10 minutos, tornándose de un grisáceo más claro. Finalmente, se procedió a la lectura, en el espectrofotómetro UV-VIS Spectronic a una longitud de onda de 546 nm. El reactivo de Griess A contiene ácido sulfanílico al 1% en ácido fosfórico al 5%. El reactivo de Griess B presentó N-1-naftiletilendiamina al 0,1%, en agua destilada. Las lecturas de absorbancia obtenidas fueron transformadas a concentración plasmática en mM, de acuerdo a la siguiente ecuación  $y = 0,044615x$  con un

coeficiente correlación:  $R^2 = 0,999$ . Donde  $x =$  concentración;  $y =$  absorbancia.

### 3.5.5.2 Actividad antiinflamatoria *in vitro* por estabilización de la membrana de glóbulos rojos.<sup>29</sup>

La evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

- a) Se recolectó sangre de una rata macho adulto normal y se mezcló con igual volumen de solución de Alsever estéril (2% dextrosa, 0,8% citrato de sodio, 0,05% ácido cítrico y 0,42% cloruro de sodio en agua).
- b) La sangre se centrifugó a 3000 rpm y el centrifugado se lavó con solución isosalina (0,85% a pH 7,2) y se llevó la solución al 10% v/v con solución isosalina, para obtener una suspensión de glóbulos rojos.
- c) La mezcla a ensayar contenía el aceite de sachá inchi a diferentes concentraciones en varios tubos (10, 50, 100, 200 ug/mL), con 1 mL de Buffer fosfato (0,15 M, pH 7,4), 2 mL de solución hiposalina (0,36%) y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos.
- d) Se utilizó hidrocortisona como fármaco de referencia 200 ug/mL en la evaluación de actividad.
- e) A otro tubo se agregó en lugar de los 2 mL de solución hiposalina, 2 ml de agua destilada (control).
- f) Todos los tubos se incubaron a 37 °C por 30 min y centrifugados a 3000 rpm.
- g) La hemoglobina contenida en la solución sobrenadante fue valorada en el espectrofotómetro a 560 nm.
- h) El indicador que se evaluó en el ensayo fue el porcentaje de hemólisis, que se calculó asumiendo que la hemólisis producida por el agua destilada es 100%.
- i) El porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos se calculó usando la siguiente expresión:

$$\text{Protección (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100$$

### **3.6. Análisis estadístico**

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas; se expresan en valores medios  $\pm$  desviación estándar con sus respectivas pruebas de significancia al 95% según la prueba de Duncan. Para determinar las diferencias entre los diferentes tratamientos se realizaron los respectivos análisis de varianza a los parámetros evaluados de los aceites crudos, ácidos grasos y los tratamientos que fueron parte del análisis de actividad farmacológica, según el programa SAS V7 (SAS Institute Inc.)<sup>33</sup> e Infostat V2011 libre<sup>34</sup>, así como los programas en entorno Windows, Word y Excel 1997-2003.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis fisicoquímico de almendras y aceites crudos <sup>35</sup>

#### 4.1.1. Humedad de almendra

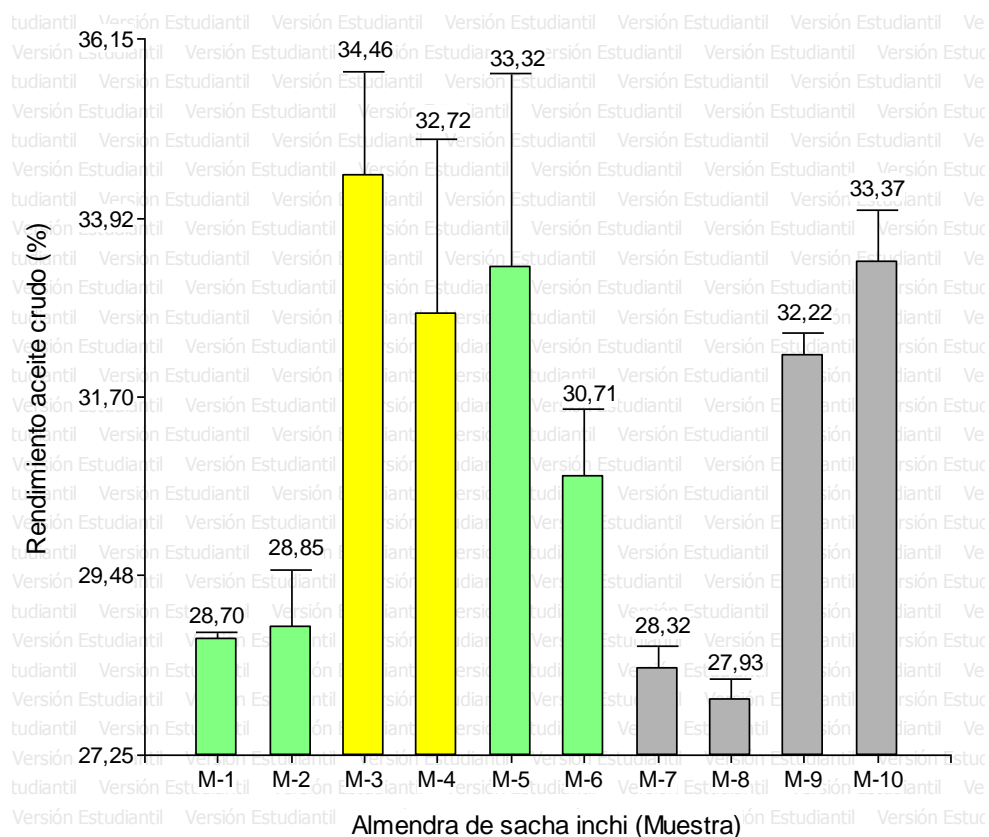
Los valores de humedad de almendra se encontraron entre 6,53% y 5,31%.Tabla 4.

#### 4.1.2. Grasa total y rendimiento de aceite crudo

Los resultados indican que las muestras del departamento de Junín presentan de manera general los valores promedio más altos, tabla 4 y gráfico 2.

#### 4.1.3. Peso específico e índice de refracción

Parámetros útiles para la identificación de aceites y que dependen de la temperatura; estos valores se detallan en la Tabla 4.



**Gráfico N°2.** Rendimientos de extracción de aceite crudo según el método de prensado. Cada barra representa el valor promedio de 2 repeticiones con su respectiva desviación estándar. M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto.de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto.de Junín.

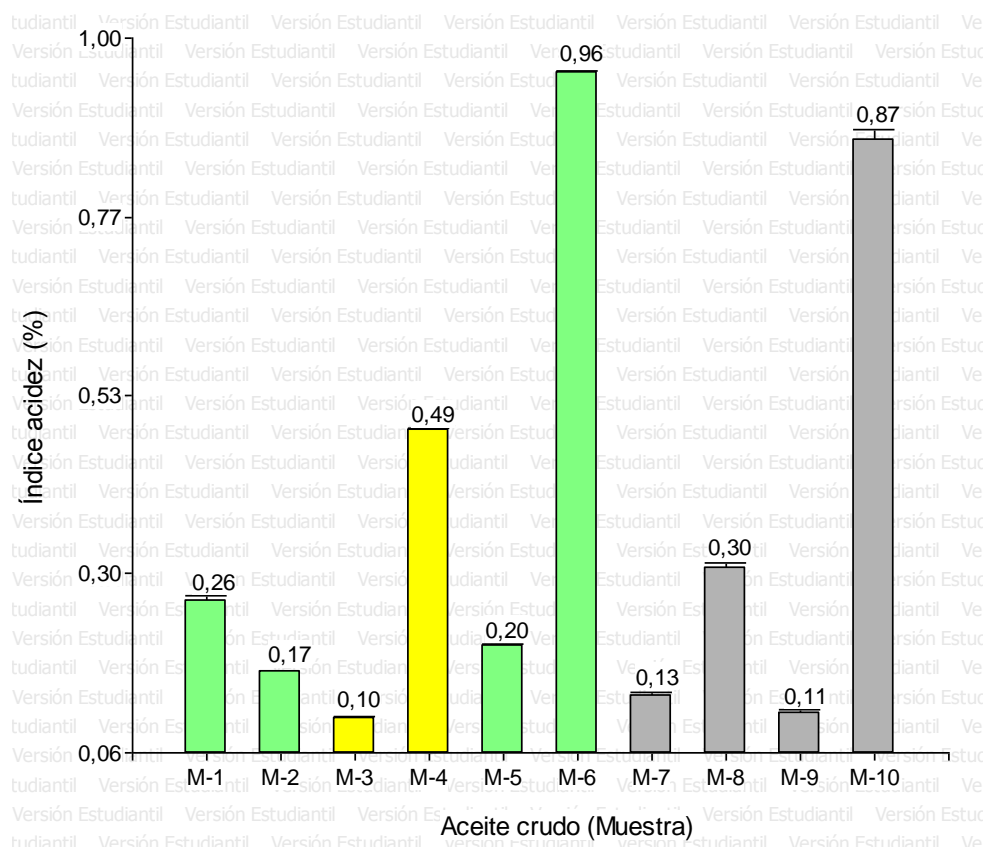
**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas de los aceites de sachu inchi de las muestras M-1 a M-10 de los departamentos de Ucayali, Huánuco y Junín

Parámetro fisicoquímico									
Muestra	H (%)***	Acrudo (%)**	Gtotal (%)***	PE (g/mL) <sup>ns</sup>	IR ***	FFA (%)***	IS (mg KOH/g)**	POV (meq O <sub>2</sub> /kg)***	VI (g Iodo/ 100g)***
M-1	6,08 ±0,04 C	28,7 ±0,08 C	50,62 ±0,94 F	0,9267 ±0,000	1,4803 ±0,000 D	0,259 ±0,008 E	187,515 ±0,900 C	8,181 ±0,205 C	190,983 ±0,773 D
M-2	6,16 ±0,01 B	28,85 ±0,70 C	52,61 ±0,66 D,E	0,9271 ±0,000	1,4805 ±0,000 C	0,166 ±0,000 G	187,822 ±2,172 C	2,173 ±1,401 D,E	194,219 ±0,162 C
M-3	5,31 ±0,03 I	34,46 ±1,29 A	47,19 ±0,63 G	0,9267 ±0,000	1,4802 ±0,000 E	0,105 ±0,002 I	189,068 ±0,267 B,C	13,6713 ±0,562 A	192,373 ±0,185 C,D
M-4	5,44 ±0,01 H	32,72 ±2,18 A,B	55,09 ±0,54 C	0,9268 ±0,000	1,4803 ±0,000 D	0,485 ±0,002 C	190,841 ±1,362 A,B	12,061 ±0,024 B	191,002 ±1,451 D
M-5	5,73 ±0,02 F	33,32 ±2,40 A,B	50,09 ±1,39 F	0,9266 ±0,000	1,4801 ±0,000 F	0,202 ±0,000 F	190,458 ±0,442 A,B	2,465 ±0,139 D	186,574 ±0,599 E
M-6	5,91 ±0,01 E	30,71 ±0,83 B,C	51,07 ±0,32 E,F	0,9271 ±0,000	1,4806 ±0,000 A	0,957 ±0,004 A	191,153 ±0,774 A,B	1,184 ±0,001 D,E,F	186,812 ±2,225 E
M-7	6,53 ±0,04 A	28,32 ±0,28 C	55,36 ±0,98 C	0,9271 ±0,000	1,4806 ±0,000 A	0,134 ±0,005 H	192,666 ±0,406 A	0,988 ±0,841 E,F	191,946 ±0,782 D
M-8	5,47 ±0,01 H	27,93 ±0,28 C	60,86 ±0,21 A	0,927 ±0,000	1,4805 ±0,000 B,C	0,305 ±0,006 D	191,027 ±0,870 A,B	0,693 ±0,139 F	197,831 ±0,206 B
M-9	5,97 ±0,05 D	32,22 ±0,28 A,B	53,19 ±0,36 D	0,927 ±0,000	1,4806 ±0,000 A	0,111 ±0,005 I	186,887 ±0,227 C	1,281 ±0,421 D,E,F	198,902 ±0,824 B
M-10	5,62 ±0,01 G	33,37 ±0,66 A,B	57,65 ±0,67 B	0,9269 ±0,000	1,4805 ±0,000 A,B	0,870 ±0,014 B	191,2 ±0,707 A,B	0,400 ±0,000 F	203,15 ±0,071 A

M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto.de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto.de Junín. H: Humedad, Acrudo: Rendimiento de aceite crudo, Gtotal: Rendimiento de grasa total, PE: Peso específico a 25 °C, IR: Índice de refracción a 25 °C, FFA: Ácidos grasos libres expresados como % de ácido oleico, IS: Índice de saponificación, POV: Índice de peróxido, VI: Valor del índice de yodo. ns, \*, \*\*, \*\*\*: Indican no significativa, significancia a  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  y  $p \leq 0,001$  respectivamente. Valores con diferentes letras dentro de cada columna denotan diferencias significativas en la prueba de Duncan con  $p \leq 0,05$ . Valores promedio de 2 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

#### 4.1.4. Ácidos grasos libres

Parámetro para la identificación de componentes resultantes de la alteración de los lípidos; se ha determinado mediante el Índice de acidez. Se indican en la tabla 4 y gráfico 3.



**Gráfico N°3.** Ácidos grasos libres de los aceites crudos de las diferentes muestras de Sacha inchi. Cada barra representa el valor promedio de 2 repeticiones con su respectiva desviación estándar. M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto.de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto.de Junín.

#### 4.1.5. Índice de saponificación

Que permite determinar si predominan los ácidos grasos de cadena corta o de cadena larga; utilizado frecuentemente para el control de adulteraciones; si predominan los ácidos grasos de cadena corta, el IS aumenta, y si predominan los de cadena larga, disminuye. Los valores obtenidos se indican en la tabla 5.

#### 4.1.6. Índice de peróxido

Que permite determinar la oxidación inicial del aceite y el deterioro que pueden haber sufrido los antioxidantes naturales como los

tocoferoles y los polifenoles. Los valores obtenidos se describen en la tabla 5.

#### **4.1.7. Índice de yodo**

Que permite determinar el grado de insaturación de una grasa o aceite; a mayor grado de insaturación, mayor índice de yodo. Los valores encontrados se describen en la tabla 5.

### **4.2. Ácidos grasos de los aceites crudos de sachá inchi**

#### **4.2.1. Ácido palmítico**

Ácido graso saturado de cadena larga, formado por dieciséis átomos de carbono, presente en carnes de res y aves de corral así como en lácteos. Sin embargo el exceso de su consumo eleva los niveles de colesterol en la sangre, considerándolo el más aterogénico. Se encontraron diferencias altamente significativas que se aprecian en la tabla 5.

#### **4.2.2. Ácido esteárico**

Ácido graso saturado de 18 átomos de carbono presente en aceites y grasas animales y vegetales; se obtiene tratando la grasa animal con agua a una alta presión y temperatura, y mediante la hidrogenación de los aceites vegetales; útil como ingrediente en la fabricación velas, jabones, plásticos, y cosméticos.

La tabla 5 describe diferencias altamente significativas con los valores más altos para las muestras del departamento de Huánuco.

#### **4.2.3. Ácido oleico**

Ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9, típico de los aceites vegetales como el aceite de oliva. Ejerce una acción beneficiosa en los vasos sanguíneos reduciendo el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares.

Las muestras de departamento de Ucayali exhiben los valores más altos y las del departamento de Junín presentan los valores más bajos. Tabla 5 y gráfico 4.

#### **4.2.4. Ácido vaccénico**

El ácido vaccénico (o ácido 11-octadecenoico), ácido graso con 18 átomos de carbono, que tiene la fórmula molecular  $C_{18}H_{34}O_2$ ; se forma como un intermedio en la biohidrogenación de ácido linoleico a ácido esteárico por acción enzimática. Dadas sus especiales características químicas nos aporta importantes beneficios, anti cáncer, antiobesidad y efectos antiaterogénicos. Las muestras del departamento de Ucayali presentaron los valores más altos mientras que las muestras del departamento de Junín los valores más bajos, tabla 5.

#### **4.2.5. Ácido linoleico**

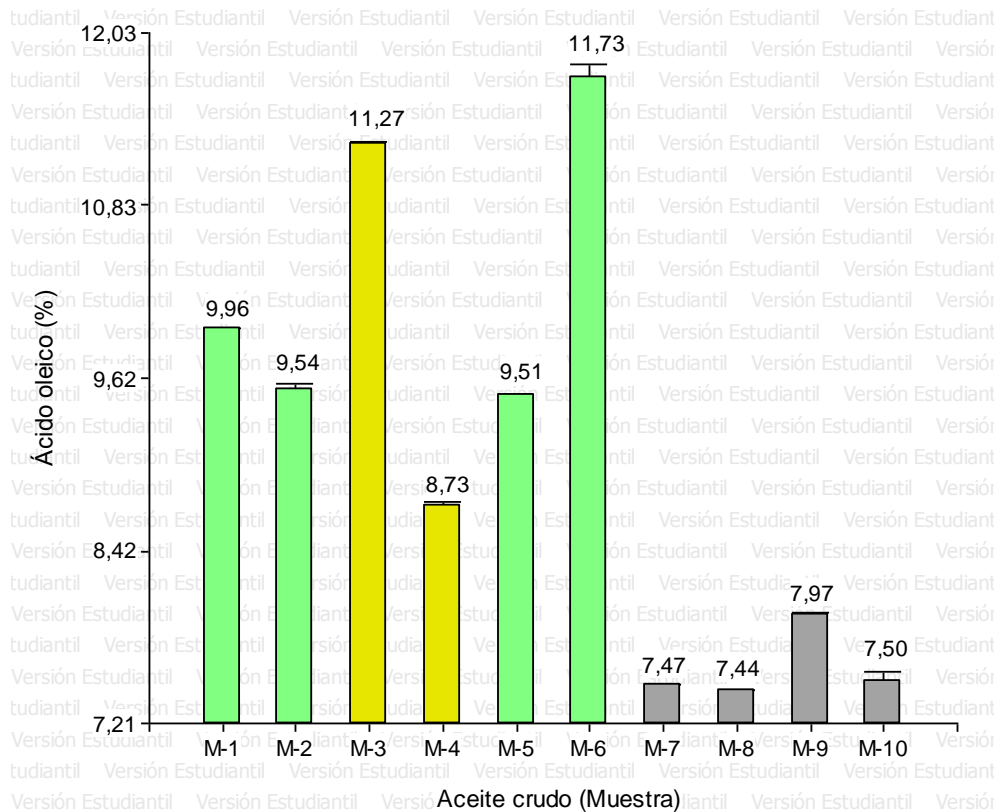
Ácido graso poliinsaturado, esencial, que tiene que ser adquirido a través de la dieta. Se encuentra en diversos aceites vegetales, tales como el de girasol o el de soya, en los huevos y en las aves de corral; la ingesta adecuada de estos ácidos grasos promueve la disminución de la concentración sanguínea de triglicéridos, disminución en la presión arterial y decremento en la agregación plaquetaria.

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 5 y gráfico 5, se observa que las muestras del departamento de Ucayali presentaron los valores promedio más altos para este ácido graso.

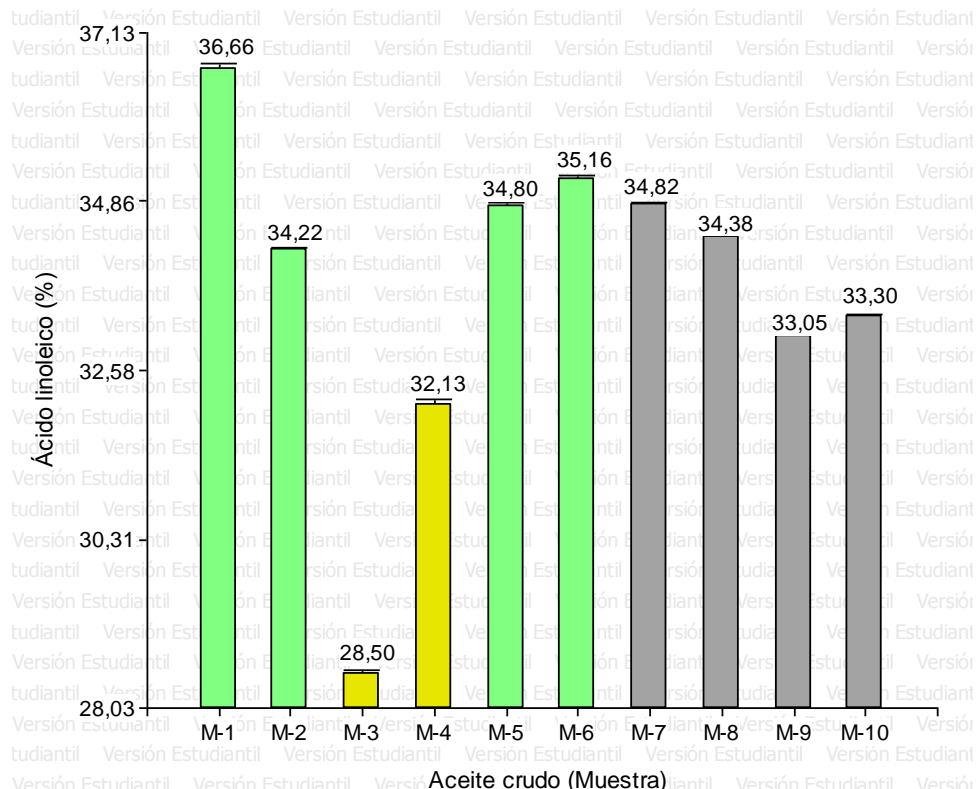
#### **4.2.6. Ácido $\alpha$ -linolénico**

El ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), ácido graso esencial para el ser humano, que al ser consumido en cantidades importantes puede ser almacenado,  $\beta$ -oxidado y/o metabolizado en sus derivados bioactivos, principalmente el DHA<sup>36</sup>. La M-10 del departamento de Junín presentó el valor promedio más alto con 52,40%, tabla 5 y gráfico 6.





**Gráfico N°4.** Contenido de ácido oleico en las diferentes muestras de aceite crudo. Cada barra representa el valor promedio de 2 repeticiones con su respectiva desviación estándar. M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto.de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto.de Junín.

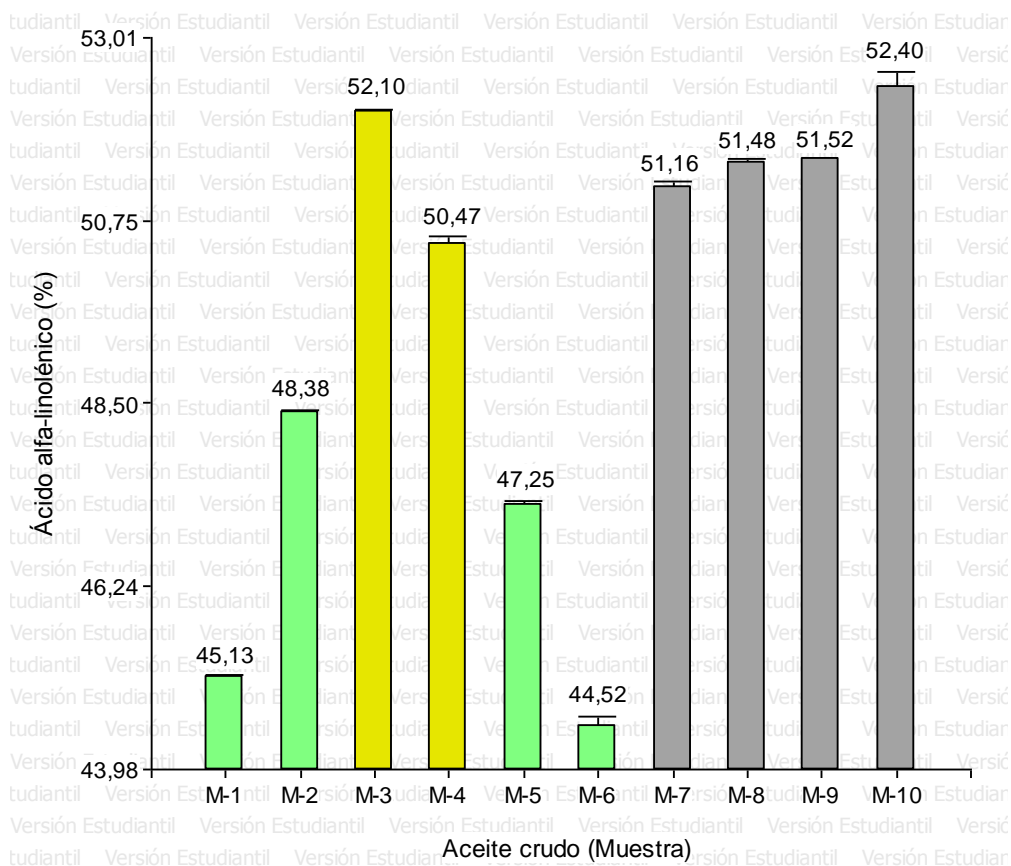


**Gráfico N°5.** Contenido de ácido linoleico en las diferentes muestras de aceite crudo. Cada barra representa el valor promedio de 2 repeticiones con su respectiva desviación estándar. M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto.de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto.de Junín.

**Tabla 5.** Ácidos grasos de los aceites crudos de sachu inchi de las muestras M-1 a M-10 de los departamentos de Ucayali, Huánuco y Junín

Muestra	Acidos grasos									
	Palmítico (%) ***	Esteárico (%) ***	Oleico (%) ***	Vacénico (%) ***	Linoleico (%) ***	$\alpha$ -Linolénico (%) ***	Eicosaenoico (%)***	Saturados (%) ***	Mono insaturados (%)***	Poli insaturados (%)***
M-1	4,01 $\pm$ 0,01 C	3,33 $\pm$ 0,00 D	9,97 $\pm$ 0,01 C	0,55 $\pm$ 0,00 A	36,655 $\pm$ 0,06 A	45,13 $\pm$ 0,02 H	0,32 $\pm$ 0,01 A	7,34 $\pm$ 0,01 C	10,83 $\pm$ 0,01 C	81,78 $\pm$ 0,08 F
M-2	3,93 $\pm$ 0,01 D	3,07 $\pm$ 0,01 F	9,55 $\pm$ 0,04 D	0,55 $\pm$ 0,00 A	34,22 $\pm$ 0,01 E	48,38 $\pm$ 0,04 F	0,31 $\pm$ 0,00 A,B	6,99 $\pm$ 0,01 E	10,41 $\pm$ 0,04 D	82,6 $\pm$ 0,06 D
M-3	3,97 $\pm$ 0,01 C,D	3,23 $\pm$ 0,00 E	11,27 $\pm$ 0,01 B	0,545 $\pm$ 0,01 A,B	28,5 $\pm$ 0,05 I	52,10 $\pm$ 0,03 B	0,30 $\pm$ 0,00 B,C,D	7,20 $\pm$ 0,01 D	12,11 $\pm$ 0,00 B	80,60 $\pm$ 0,02 G
M-4	4,26 $\pm$ 0,03 A,B	3,57 $\pm$ 0,01 A	8,73 $\pm$ 0,03 E	0,57 $\pm$ 0,00 A	32,13 $\pm$ 0,08 H	50,48 $\pm$ 0,09 E	0,27 $\pm$ 0,00 E	7,83 $\pm$ 0,04 A	9,57 $\pm$ 0,03 E	82,60 $\pm$ 0,01 D
M-5	4,22 $\pm$ 0,01 B	3,41 $\pm$ 0,00 B	9,51 $\pm$ 0,00 D	0,51 $\pm$ 0,01 C	34,80 $\pm$ 0,04 C	47,26 $\pm$ 0,05 G	0,30 $\pm$ 0,01 C,D	7,63 $\pm$ 0,01 B	10,31 $\pm$ 0,00 D	82,06 $\pm$ 0,01 E
M-6	4,31 $\pm$ 0,01 A	3,36 $\pm$ 0,01 C	11,73 $\pm$ 0,08 A	0,57 $\pm$ 0,03 A	35,16 $\pm$ 0,05 B	44,52 $\pm$ 0,12 I	0,30 $\pm$ 0,00 B,C,D	7,67 $\pm$ 0,03 B	12,60 $\pm$ 0,11 A	79,67 $\pm$ 0,07 H
M-7	3,36 $\pm$ 0,04 G	2,36 $\pm$ 0,00 J	7,48 $\pm$ 0,01 G	0,52 $\pm$ 0,00 B,C	34,82 $\pm$ 0,01 C	51,16 $\pm$ 0,07 D	0,31 $\pm$ 0,01 A,B,C	5,72 $\pm$ 0,04 I	8,30 $\pm$ 0,00 G	85,98 $\pm$ 0,06 A
M-8	3,41 $\pm$ 0,02 G	2,44 $\pm$ 0,01 I	7,44 $\pm$ 0,01 G	0,52 $\pm$ 0,00 B,C	34,39 $\pm$ 0,02 D	51,48 $\pm$ 0,04 C	0,30 $\pm$ 0,00 B,C,D	5,84 $\pm$ 0,01 H	8,26 $\pm$ 0,01 G	85,86 $\pm$ 0,06 A
M-9	3,71 $\pm$ 0,00 E	2,93 $\pm$ 0,00 G	7,98 $\pm$ 0,01 F	0,52 $\pm$ 0,00 B,C	33,06 $\pm$ 0,01 G	51,52 $\pm$ 0,00 C	0,29 $\pm$ 0,00 D	6,64 $\pm$ 0,00 F	8,79 $\pm$ 0,01 F	84,58 $\pm$ 0,01 C
M-10	3,54 $\pm$ 0,04 F	2,56 $\pm$ 0,02 H	7,51 $\pm$ 0,06 G	0,51 $\pm$ 0,02 C	33,30 $\pm$ 0,04 F	52,40 $\pm$ 0,20 A	0,21 $\pm$ 0,01 F	6,09 $\pm$ 0,06 G	8,22 $\pm$ 0,09 G	85,70 $\pm$ 0,16 B

M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto. de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto. de Junín. Palmítico: Ácido palmítico, Esteárico: Ácido esteárico, Oleico: Ácido oleico, Vacénico: Ácido vacénico, Linoleico: Ácido linoleico,  $\alpha$ -Linolénico: Ácido  $\alpha$ -Linolénico, Eicosaenoico: Ácido eicosaenoico, Saturados: Total de ácidos grasos saturados, Monoinsaturados: Total de ácidos grasos monoinsaturados, Poliinsaturados: Total de ácidos grasos poliinsaturados. \*\*\*: Indica diferencias altamente significativas  $p \leq 0,001$ . Valores con diferentes letras dentro de cada columna denotan diferencias significativas en la prueba de Duncan con  $p \leq 0,05$ . Valores promedio de 2 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.



**Gráfico N°6.** Contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico en las diferentes muestras de aceite crudo. Cada barra representa el valor promedio de 2 repeticiones con su respectiva desviación estándar. M-1, M-2, M-5 y M-6: Muestras del dpto.de Ucayali; M-3 y M-4: Muestras del dpto. de Huánuco; M-7, M-8, M-9 y M-10: Muestras del dpto.de Junín.

#### 4.2.7. Ácido eicosaenoico

El ácido eicosanoico, también denominado ácido araquídico, es un ácido graso saturado, constituyente del aceite de maní. Se puede obtener mediante hidrogenación del ácido araquidónico; la reducción del ácido araquídico permite obtener alcohol araquidílico. Los resultados se indican en la tabla 5.

#### 4.2.8. Ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados

Todos los ácidos grasos presentes en los aceites crudos del sacha inchi fueron agrupados según su naturaleza y sus valores se describen en la tabla 5.

### 4.3. Actividad antiinflamatoria del aceite crudo de sacha inchi

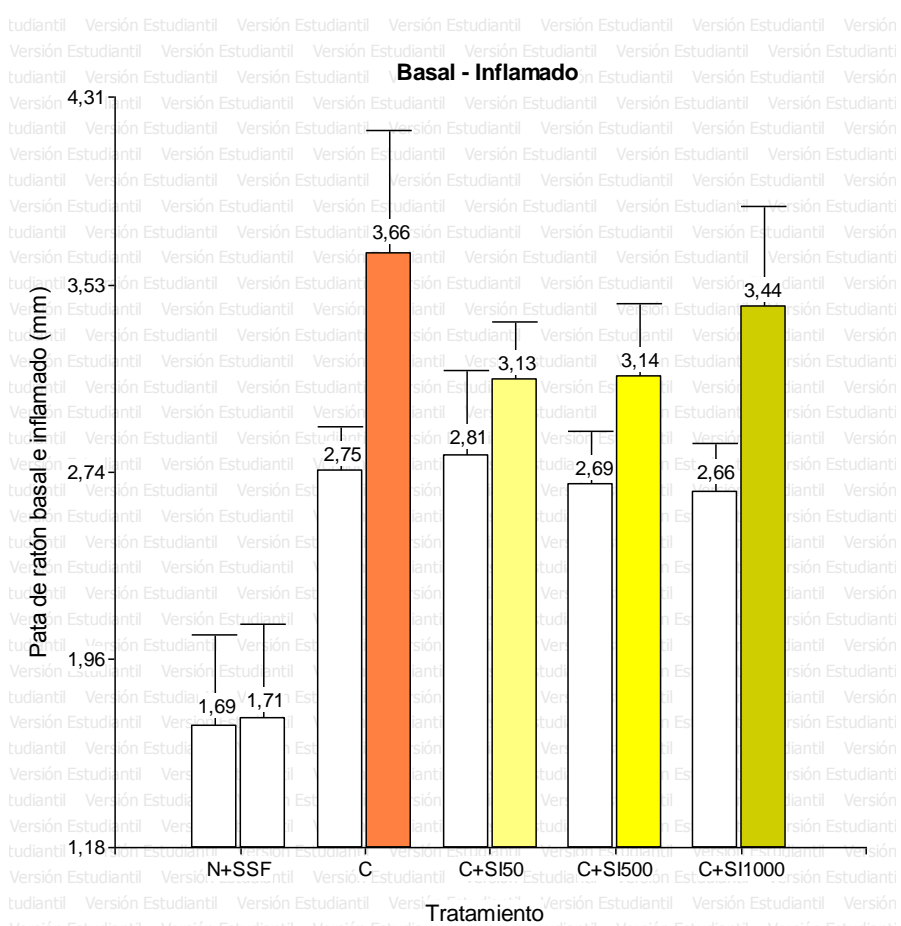
#### 4.3.1. Actividad antiinflamatoria *in vivo* en ratones

Los resultados obtenidos se indican en la tabla 6 y gráfico 7.

**Tabla 6.** Parámetros de inflamación según el método de edema subplantar en ratón.

Tratamiento	Parámetros de inflamación				
	MDA x 10 <sup>-6</sup> (mol/L) **	Óxido nítrico (umol/L) ***	Basal (mm) ***	Inflamado (mm) ***	Basal - inflamado (mm) **
N+SSF	0,007 ± 0,003 B	0,651 ± 0,389 B	1,688 ± 0,379 B	1,715 ± 0,394 C	0,027 ± 0,051 B
C	8,09 ± 6,939 A	129,55 ± 52,321 A	2,75 ± 0,182 A	3,657 ± 0,509 A	0,907 ± 0,582 A
C+SI50	3,558 ± 2,139 B	23,636 ± 14,781 B	2,813 ± 0,354 A	3,132 ± 0,242 B	0,42 ± 0,246 A,B
C+SI500	2,962 ± 1,294 B	16,202 ± 14,166 B	2,692 ± 0,223 A	3,14 ± 0,307 B	0,448 ± 0,254 A,B
C+SI1000	3,494 ± 0,554 B	6,521 ± 4,300 B	2,662 ± 0,202 A	3,437 ± 0,414 A,B	0,775 ± 0,523 A

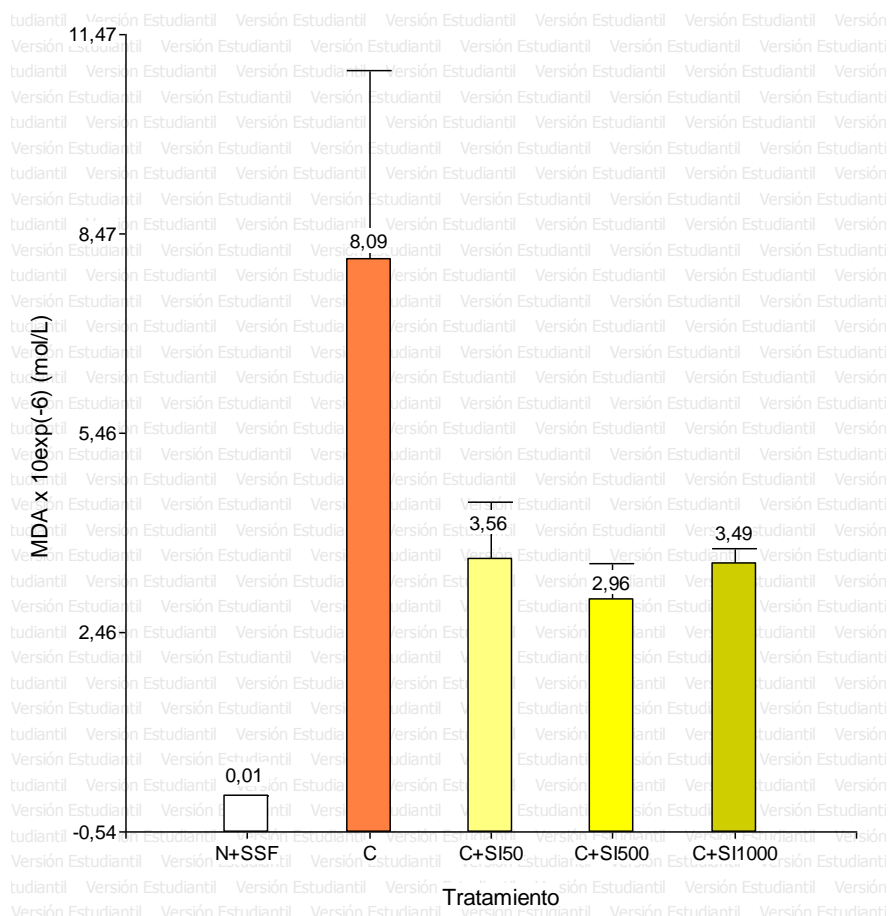
N+SSF: Grupo normal + solución de suero fisiológico, C: Grupo con carragenina, C+SI50: Grupo de carragenina + 0,05 mL de aceite de sacha inchi, C+SI500: Grupo de carragenina + 0,5 mL de aceite de sacha inchi, C+SI1000: Grupo de carragenina + 1 mL de aceite de sacha inchi. MDA: Malondialdehído. Valores con diferentes letras dentro de cada columna denotan diferencias significativas en la prueba de Duncan con  $p \leq 0,05$ . Valores promedio de 6 repeticiones ± desviación estándar.



**Gráfico N°7.** Actividad antiinflamatoria de los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón. N+SSF: Grupo normal + solución de suero fisiológico, C: Grupo con carragenina, C+SI50: Grupo de carragenina + 0,05 mL de aceite de sacha inchi, C+SI500: Grupo de carragenina + 0,5 mL de aceite de sacha inchi, C+SI1000: Grupo de carragenina + 1 mL de aceite de sacha inchi. En cada tratamiento se compara el basal e inflamado. Cada barra representa el valor promedio de 6 repeticiones.

#### 4.3.1.1. Cuantificación del nivel de malondialdehido.-

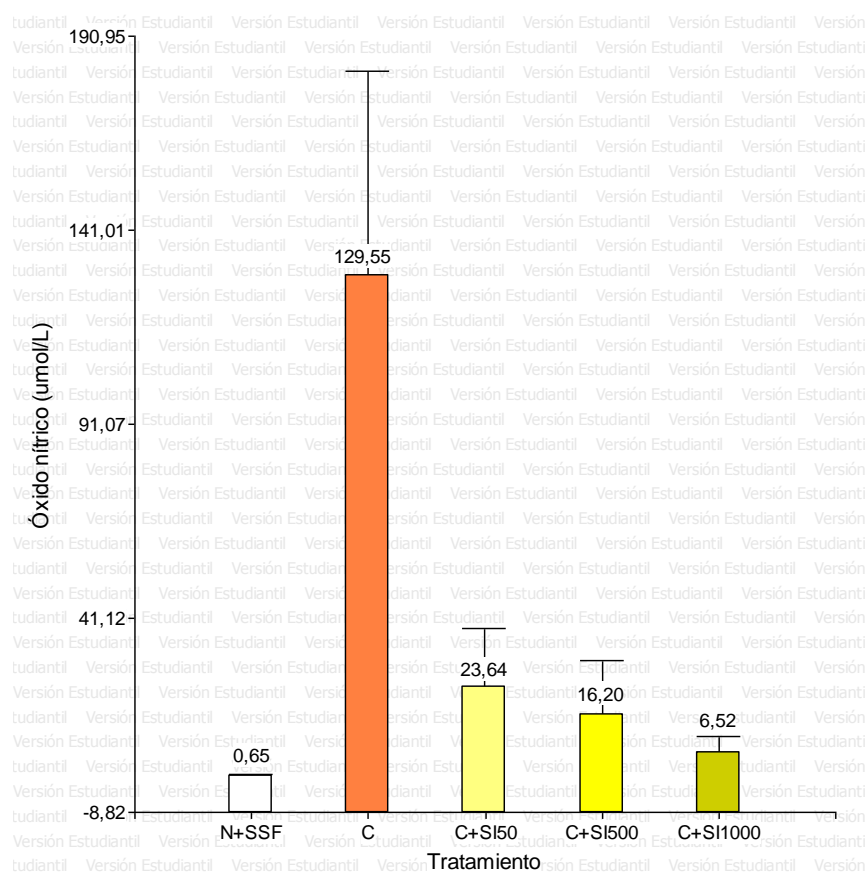
En la tabla 6 y gráfico 8 se observan los valores de malondialdehido (MDA) en los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón.



**Gráfico N°8.** Niveles de MDA en los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón. N+SSF: Grupo normal + solución de suero fisiológico, C: Grupo con carragenina, C+SI50: Grupo de carragenina + 0,05 mL de aceite de sacha inchi, C+SI500: Grupo de carragenina + 0,5 mL de aceite de sacha inchi, C+SI1000: Grupo de carragenina + 1 mL de aceite de sacha inchi. Cada barra representa el valor promedio de 6 repeticiones.

#### 4.3.1.2. Cuantificación del nivel de óxido nítrico.-

Los valores de óxido nítrico en los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón, se reportan en la tabla 6 y gráfico 9.



**Gráfico N°9.** Niveles de óxido nítrico en los diferentes tratamientos según el método del edema subplantar con carragenina en ratón. N+SSF: Grupo normal + solución de suero fisiológico, C: Grupo con carragenina, C+SI50: Grupo de carragenina + 0,05 mL de aceite de sachá inchi, C+SI500: Grupo de carragenina + 0,5 mL de aceite de sachá inchi, C+SI1000: Grupo de carragenina + 1 mL de aceite de sachá inchi. Cada barra representa el valor promedio de 6 repeticiones.

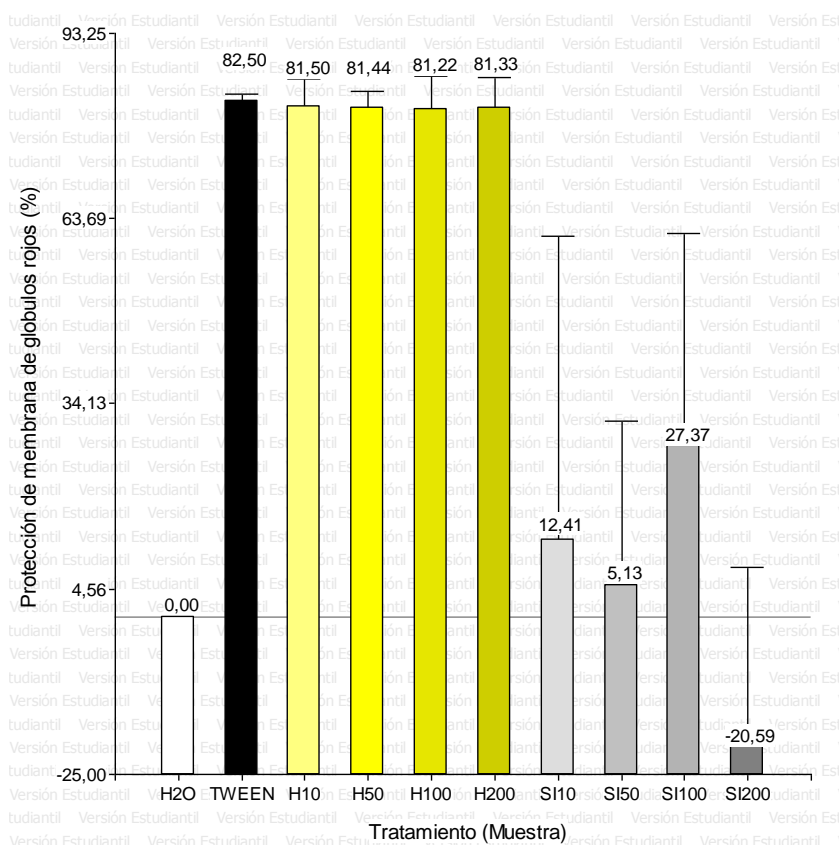
#### 4.3.2. Actividad antiinflamatoria *in vitro*

Los resultados de protección de membrana de los glóbulos rojos hallados presentan diferencias altamente significativas que se aprecian en tabla 7 y gráfico 10.

**Tabla 7.** Protección de membrana de glóbulos rojos según ensayo *in vitro*

	Agua	Tween 80	Hidrocortisona				Aceite de sachá inchi			
			H10	H50	H100	H200	SI10	SI50	SI100	SI200
Protección (%)***	0,00	82,50	81,50	81,44	81,22	81,33	12,41	5,13	27,37	-20,58
	±0,00 D	±0,99 A	±4,59 A	±2,47 A	±5,26 A	±4,84 A	±48,56 B	±26,29 C	±34,05 B	±28,52 C

H10: Hidrocortisona 10 µg, H50: Hidrocortisona 50 µg, H100: Hidrocortisona 100 µg, H200: Hidrocortisona 200 µg, SI10: Aceite sachá inchi 10 µg, SI50: Aceite sachá inchi 50 µg, SI100: Aceite sachá inchi 100 µg, SI200: Aceite sachá inchi 200 µg. Valores con diferentes letras dentro de fila denotan diferencias significativas en la prueba de Duncan con  $p \leq 0,05$  para protección (%) de membrana de los glóbulos rojos. Valores promedio de 4 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.



**Gráfico N°10.** Protección de membrana de glóbulos rojos según ensayo *in vitro*. H10: Hidrocortisona 10 µg, H50: Hidrocortisona 50 µg, H100: Hidrocortisona 100 µg, H200: Hidrocortisona 200 µg, SI10: Aceite sachá inchi 10 µg, SI50: Aceite sachá inchi 50 µg, SI100: Aceite sachá inchi 100 µg, SI200: Aceite sachá inchi 200 µg. Valores con diferentes letras dentro de fila denotan diferencias significativas en la prueba de Duncan con  $p \leq 0,05$  para protección (%) de membrana de los glóbulos rojos. Cada barra representa el valor promedio de 4 repeticiones  $\pm$  desviación estándar.

## V. DISCUSIÓN

Los valores de humedad de almendra de sachá inchi obtenidos, se encontraron entre 6,53% y 5,31% sobresaliendo significativamente la muestra-7 de Junín. Según la prueba de Duncan al 95%, la muestra-3 de Huánuco presentó el valor más bajo (tabla 4). Los valores de humedad, dentro de los procesos de postcosecha son de enorme importancia porque su presencia en cantidades significativas puede conducir a procesos de enranciamiento y posterior descomposición de la materia prima. Al respecto Mejía <sup>10</sup>, en los análisis de almendras procedentes del INIA Pucallpa, reporta el valor promedio de 6,37% de humedad, que se ubica dentro de los valores encontrados en esta investigación.

Los resultados de grasa total de las almendras, obtenidos por el método de Soxhlet, indican que las muestras del departamento de Junín presentan de manera general los valores promedio más altos. (Tabla 4). Follegatti-Romero *et al.* <sup>37</sup>, en la investigación sobre extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> de semillas de sachá inchi de Tingo María, reportan el valor de extracción con solvente de 54,3%, por su parte Mejía <sup>10</sup> en la caracterización del aceite de sachá inchi del INIA Pucallpa indica el rendimiento de grasa total de 51,4% en base húmeda para el aceite extraído con solvente.

En la extracción de aceite crudo de las almendras de sachá inchi, realizada según el método de prensado en la prensa hidráulica, los valores en la investigación se encontraron dentro de los 27,93 y 34,46%, sobresaliendo significativamente la muestra-3 de Huánuco según la prueba de significancia de Duncan al 95%, la muestra-8 de Junín presentó el valor más bajo, tabla 4 y gráficos 2 y 3.

El análisis de varianza y prueba de significancia de Duncan al 95% para el peso específico, indican que no existen diferencias significativas; mientras que para el índice de refracción si existen diferencias significativas, siendo los



aceites de las muestras M-6 y M-7 los que presentaron los valores promedio más altos entre los diferentes aceites crudos, tabla 4.

Respecto a los ácidos grasos libres expresados como porcentaje de ácido oleico, el análisis de varianza y prueba de significancia de Duncan al 95% reporta diferencias significativas entre los diferentes aceites crudos, tabla 4 y gráfico 4. De manera general, los valores de ácidos grasos libres fueron bajos para los aceites estudiados, en relación a los valores de este parámetro. Estos dependen de las deficientes prácticas de manejo post cosecha de las semillas, que causan su deterioro y posterior hidrólisis de los triglicéridos presentes en la almendra; su valor se constituye en un factor de calidad.

En cuanto al índice de saponificación, los aceites crudos de la muestra-7 de Junín presentaron el valor promedio más alto (192,9537 mg KOH/g de muestra), mientras que la muestra-9 de la misma región presentó el valor más bajo (186,7276 mg KOH/g de muestra). El análisis de varianza y prueba de significancia de Duncan al 95% indica diferencias significativas entre los diferentes aceites crudos, tabla 3. Al respecto, Mejía <sup>10</sup> en el análisis fisicoquímico del aceite crudo de sachá inchi reporta el valor de 229,583 mg KOH/g aceite, superior a los encontrados en la investigación. Por otro lado Follegatti-Romero *et al.* <sup>37</sup>, reportan el valor promedio de 193 mg KOH/g de aceite crudo para el sachá inchi de Tingo María - departamento de Huánuco, que se encuentra dentro de los valores encontrados en la investigación.

En relación al índice de peróxido, que se asocia a procesos oxidativos de los aceites, los valores obtenidos (entre 14,0686 y 0,4000 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite crudo para la muestra-3 de Huánuco y la muestra-10 de Junín respectivamente, el análisis de varianza y prueba de significancia de Duncan al 95% de los índices de peróxido de los diferentes aceites señala diferencias significativas entre las diferentes muestras de aceites crudos, tabla 3. Al respecto, Gorriti *et al.* <sup>19</sup> en la investigación sobre toxicidad del aceite de sachá inchi, reportan el valor promedio de 0,889 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite crudo para el sachá inchi, mientras que Mejía <sup>10</sup>, reporta el valor de 4,139 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite crudo de la zona de Pucallpa-Ucayali.

Las insaturaciones de los ácidos grasos del aceite de sachá inchi evaluadas a través del índice de yodo, reportaron entre 203,1000 g de I<sub>2</sub>/100 g de aceite para la muestra-10 de Junín y 185,2387 g de I<sub>2</sub>/100 g de aceite para la muestra-5 de Ucayali; el análisis de varianza y prueba de significancia de Duncan al 95% muestra diferencias significativas entre los diferentes aceites crudos, tabla 3. Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup>, en el aceite de sachá inchi obtenido por extracción supercrítica reportan un índice de yodo dentro de los valores encontrados en la investigación de 198 g I<sub>2</sub>/100 g aceite; mientras que Ángeles<sup>38</sup> en su trabajo de estabilidad menciona un valor mucho menor a los encontrados en la investigación de 174,814 comparado con 198 g I<sub>2</sub>/100 g aceite.

Los resultados promedio de ácido palmítico indican diferencias altamente significativas entre los diferentes aceites crudos, encontrándose entre 3,36 y 4,22% para los aceites crudos de los departamentos de Junín y Ucayali respectivamente; las muestras de Huánuco presentaron valores intermedios, tabla 5. En relación a los resultados hallados por otros investigadores, los valores de ácido palmítico estuvieron dentro de los reportados por Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup> y Ángeles<sup>38</sup>.

Respecto al ácido esteárico, presente en carnes, cereales, pescado, lácteos, manteca de cacao, sebo de vacuno y mantequilla, los valores en la investigación para los diferentes aceites crudos indican diferencias altamente significativas. Las muestras del departamento de Huánuco presentaron los valores más altos (3,57 y 3,41%), tabla 5. Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup>, Mejía<sup>10</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup> reportan respectivamente valores de 2,50, 2,23 y 3,20%, similares a los hallados en la investigación.

Los contenidos de ácido oleico, (ácido graso omega -9 -con propiedades nutricionales antioxidantes y de importancia en el consumo humano, presente en numerosas oleaginosas como la palta, el maní y el olivo entre otros) estuvieron entre los 7,44 y 11,73%, y de acuerdo a los resultados, las muestras del departamento de Ucayali presentan los valores más altos, mientras que las muestras del departamento de Junín presentan los valores más bajos,

diferencias que posiblemente se deban al tipo de suelos de las zonas productoras, con diferentes altitudes sobre el nivel del mar y las características genéticas propias de cada semilla, tabla 5 y gráfico 4, que deben verificarse posteriormente con investigaciones adicionales sobre los temas indicados. Investigaciones realizadas sobre el contenido de este ácido graso en el sachá inchi indican que los valores hallados en la investigación concuerdan con los encontrados por Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup>, Mejía<sup>10</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup>.

Los valores de ácido vacénico encontrados, entre 0,51 y 0,57% para los aceites crudos de las diferentes muestras de sachá inchi, indican que las muestras del departamento de Ucayali presentaron los valores más altos, mientras que las muestras del departamento de Junín los valores más bajos, tabla 5. Otros investigadores como Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup>, no reportan ácido vacénico dentro de sus investigaciones; posiblemente explicadas porque los contenidos de este ácido graso en los aceites crudos de sachá inchi son relativamente bajos, por debajo de 0,60% para las muestras investigadas.

Para el caso del ácido linoleico, ácido de tipo omega -6, presente en numerosas fuentes de origen vegetal- se encontraron valores promedio entre 28,50 y 36,66%. De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 5 y gráfico 5, se observa que las muestras del departamento de Ucayali presentaron los valores promedio más altos para este ácido graso y las muestras del departamento de Junín presentaron valores intermedios. Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup> en sus investigaciones con este ácido graso en el aceite de sachá inchi obtenido a través del método de fluido supercrítico y otro método de extracción de aceites, mencionan valores de 34,08 y 36,80% respectivamente, los que se encontraron dentro de los reportados en la investigación.

Los contenidos de ácido  $\alpha$ -linolénico, evaluados a través de análisis de varianza y prueba de significancia de Duncan al 95%, revelan diferencias altamente significativas entre los diferentes aceites crudos; la M-10 del Departamento de Junín presentó el valor promedio más alto con 52,40%, tabla 5 y gráfico 6. Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup>, en

sus investigaciones con aceite de sachá inchi reportan respectivamente valores de 47,06, 50,41 y 45,20%, que se encuentran dentro de los hallados en la investigación para este ácido graso.

De los valores de ácido eicosanoico encontrado (entre 0,21 y 0,32%) sobresale la muestra M-1, tabla 5. De manera general, se observa contenidos relativamente bajos de este ácido graso en los aceites crudos; al respecto Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, señalan el valor promedio de 0,27% en la investigación que realizaron, mientras que Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup>, no reportan este ácido graso en sus investigaciones.

Los ácidos grasos presentes en los aceites crudos del sachá inchi se agruparon según su naturaleza. El ácido palmítico y el ácido esteárico conforman los ácidos grasos saturados, mientras que el ácido oleico, el ácido vacénico y el ácido eicosapentaenoico los ácidos grasos monoinsaturados, y finalmente el ácido linoleico y el  $\alpha$ -linolénico conforman los ácidos grasos poliinsaturados. El análisis de varianza de los ácidos grasos saturados de las diferentes muestras de sachá inchi, indican diferencias altamente significativas entre las muestras, donde la muestra M-4 presenta el valor más alto con 7,83% de saturados, tabla 5, al respecto otros investigadores como Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, indican el valor promedio de 6,91%, Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup>, el valor de 6,74% y Hamaker *et al.*<sup>9</sup>, el valor de 7,70% cercano al valor más alto encontrado en la investigación. En el caso de los monoinsaturados, los valores hallados en la investigación se encontraron entre los 8,26 y 12,60%, tabla 5, otras investigaciones con el aceite crudo de sachá inchi revelan valores, dentro de los encontrados en la investigación, así Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup>, y Hamaker *et al.*<sup>9</sup>, reportan valores de 9,86, 8,41 y 9,60% de ácidos grasos monoinsaturados. En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, las muestras M-7 y M-8 presentaron los valores promedio más altos, mientras que la muestra M-6 presentó el valor más bajo, tabla 5, teniendo en cuenta la importancia de estos ácidos grasos Gorriti *et al.*<sup>19</sup>, Follegatti-Romero *et al.*<sup>37</sup> y Hamaker *et al.*<sup>9</sup> reportaron valores dentro de los hallados en la investigación y que fueron de 83,24, 84,49 y 82,00% respectivamente.

Es preciso señalar que en este proceso de investigación se buscó evaluar si Sacha inchi tenía efecto antiinflamatorio o no, para posteriormente a través de otros estudios se pueda comparar dicho efecto con estándares antiinflamatorios como un AINE y un corticoide.

La actividad antiinflamatoria *in vivo* en ratones, según el método del edema subplantar con carragenina, presenta resultados con diferencias altamente significativas; con  $p \leq 0,001$  entre los diferentes tratamientos (tabla 6 y gráfico 7) los cuales indican que el tratamiento con carragenina presenta el valor promedio de inflamación más alto, mientras que en el basal el tratamiento N+SSF presentó el valor más bajo. Adicionalmente se compararon las diferencias entre los valores basales e inflamados a través de análisis de varianza entre los diferentes tratamientos, cuyo análisis de significancia según Duncan al 95% indica que los tratamientos con carragenina (C) y carragenina+1 mL de aceite de sachá inchi/animal (C+S11000) presentan significativamente las mayores diferencias.

Estos resultados señalan que la dosis recomendada debe encontrarse entre los 0,05 y 0,5 mL de aceite de sachá inchi/animal debido a que presentaron estadísticamente el mismo efecto antiinflamatorio sobre el edema subplantar en los animales de experimentación, tabla 6. En relación a los valores de malondialdehído (MDA), se observa que el tratamiento con carragenina (C) presentó estadísticamente el valor más alto, si bien no existen diferencias entre los tratamientos con aceite de sachá inchi, se observa que los niveles de MDA son inferiores para los tratamientos indicados, tabla 6 y gráfico 8. Al observar la composición del aceite crudo de sachá inchi, se observa la presencia de los ácidos linoleico y  $\alpha$ -linolénico que en el organismo una parte metaboliza según oxidación-B y la otra parte sirve para la síntesis de ácidos grasos de cadena más larga que subsecuentemente participan en mecanismos de formación de antiinflamatorios.

En ese sentido Johnson y Fritsche<sup>39</sup>, en su investigación sobre el efecto en la dieta del ácido linoleico sobre marcadores de inflamación en personas saludables, a través de una revisión sistemática de ensayos randomizados y

controlados a nivel mundial, establecieron que no existe evidencia científica disponible que indique que el ácido linoleico incremente los marcadores de inflamación en personas saludables, y que se encuentran de acuerdo con los resultados hallados en la investigación en animales de experimentación. Por otro lado, Saravanan *et al.*<sup>40</sup>, indican que los ácidos grasos omega-3 (PUFAs) ejercen una acción antiinflamatoria o inmunomoduladora a través de varios mecanismos observados en experimentos con animales. Los valores de óxido nítrico, reportados en la investigación confirman los valores de inflamación en pata de ratón y de MDA en los diferentes tratamientos, en este caso el análisis de varianza de los diferentes tratamientos indica diferencias altamente significativas entre el grupo con carragenina (C) y los otros tratamientos, tabla 6 y gráfico 9.

Al respecto, Conforti *et al.*<sup>41</sup>, en su estudio sobre fitonutrientes bioactivos (ácidos grasos omega, tocoferoles, polifenoles) asociado a la inhibición de la producción *in vitro* de óxido nítrico y su actividad antioxidante de vegetales que se consumen y no cultivan en la dieta mediterránea, llegaron a la conclusión que las semillas que presentan en su composición ácidos grasos omega-3 y omega-6 pueden ser considerados como antiinflamatorios debido a que inhiben la producción de NO *in vitro*. Por otro lado Chiaradia *et al.*<sup>42</sup>, en la síntesis de nuevas drogas chalcona con actividad antiinflamatoria empleando relaciones cuantitativas de estructura – actividad (QSAR), indican que dentro de las estrategias para la obtención de nuevas drogas con actividad antiinflamatoria se considera la inhibición de óxido nítrico (NO) *in vivo*, debido a que el NO producido a partir de L-arginina y oxígeno molecular por reacción catalizada por óxido nítrico sintasa (NOS), juega un rol fisiológico importante incluyendo neurotransmisión y homeostasis vascular, que se expresa en numerosas células. En ese sentido los resultados mostrados en el gráfico 9, confirman los valores hallados en MDA en los diferentes tratamientos y edema subplantar en pata de ratón, donde los tratamientos con aceite de sachá inchi presentan actividad antiinflamatoria.

Los resultados de protección de membrana de los glóbulos rojos hallados, revelan que los diferentes tratamientos presentan diferencias altamente significativas en  $p \leq 0,001$ , como se aprecia en la tabla 7 y gráfico 10. La prueba

de Duncan al 95%, indica que el tratamiento Tween 80 y los tratamientos con hidrocortisona en 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}$  no presentan diferencias significativas entre sí, y se etiquetan con la letra A. Los tratamientos con aceite de sachá inchi en diferentes dosis indican valores bajos de protección de membrana de los glóbulos rojos, tabla 6 y gráfico 10.

Con respecto a los valores de protección del aceite de sachá inchi, las dosis 10 y 100  $\mu\text{g}$  presentan los mayores promedio de protección (%), mientras que el tratamiento en 200  $\mu\text{g}$  presentó un valor promedio de protección de membrana negativo, la observación adicional al respecto es que la naturaleza lipofílica del aceite formó una emulsión en la suspensión y consecuentemente una limitada interacción entre el aceite y la membrana de los glóbulos rojos, como se observa en el gráfico 10.

Con respecto a la metodología implementada, no se observaron antecedentes, por lo que se deberá efectuar mayor cantidad de ensayos para confirmar o rechazar los resultados hallados en la presente investigación para el aceite de sachá inchi.

## VI. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en la determinación de los índices de yodo, saponificación, acidez y peróxido de los aceites de semillas comerciales de sacha inchi de los departamentos de Junín, Huánuco y Ucayali se encuentran dentro de los valores que otorgan la calidad y pureza del aceite.
2. Respecto a los contenidos de omegas 3, 6 y 9; evaluados por cromatografía de gases; las muestras del departamento del Dpto. de Ucayali presentaron los valores más altos de ácido oleico (ácido graso omega 9), ácido vacénico y ácido linoleico –(omega 6); las muestras del departamento de Junín presentaron los valores más altos de ácido alfa linolénico, (omega -3) y los valores más bajos de ácido palmítico, esteárico y oleico mientras que las muestras de Huánuco presentaron los valores más altos de aceite crudo y ácido esteárico.
3. El aceite de sacha inchi presenta actividad antiinflamatoria *in vivo* significativa, la que se evidencia en los valores obtenidos en la cuantificación de malondialdehído y óxido nítrico luego del tratamiento.
4. El aceite de sacha inchi no presenta actividad antiinflamatoria *in vitro* significativa, como se evidencia en la limitada protección de membrana de glóbulos rojos de rata.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flores, D. Proyecto Perubiodiverso. Base de Datos Información bibliográfica sobre Historia y Usos tradicionales de 3 Plantas seleccionadas PBD-GTZ 2010.
2. Arévalo G. El cultivo del sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) en la Amazonía. Proyecto de Suelos Tropicales, Instituto Nacional de Investigación Agraria. Lima; 1996.
3. Dosdert N, Roque J, Brokamp G, Cano A, La Torre M, Weigend M. Hojas Botánicas: Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). Proyecto Desarrollo de monografías botánicas (factsheets) para cinco cultivos peruanos, Documento D38/08-13. Museo de Historia Natural, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2009.
4. Gillespie L. A revision of paleotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species from Madagascar. *Syst. Bot.* 2007; 32(4), 780-802.
5. Brack A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles de Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas". Cuzco; 1999.
6. Macbride J. Euphorbiaceae, Flora of Perú. *Field Mus. Nat. Hist. Bot.* 1995; 13(3A/1): 3-200.
7. Mostacero L, Mejia C. Taxonomía de fanerógamas peruanas. Concytec. Trujillo; 1993. 219 p.
8. Busmann R, Téllez C, Glenn A. (2009). *Plukenetia huayllabambana* sp. nov. (Euphorbiaceae) from the upper Amazon of Peru. *Nordic Journal of Botany.* 2009; 27: 313-315.
9. Hamaker B, Valles C, Gilman R, Hardmeier D, Clark H, García H, Gonzales A, Kohlsted I, Castro M. Amino Acid and Fatty Acid Profiles of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L.) *Cereal Chem.* 1992; 69:461-463.
10. Mejía, M. Extracción y refinación del aceite de sacha inchi. Tesis para optar el Título de Ingeniero de Industrias Alimentarias, Facultad de Industrias Alimentarias, UNALM, Lima; 1997.

11. Hazen D., Stowesand Y. Resultados de análisis de aceite y proteína del cultivo de sachá inchi. Universidad de Cornell. USA; 1980.
12. Bodwell C., Hopkins D. Nutritional characteristics of oilseed proteins. *New Protein Foods*. 1985;5: 221-257.
13. Joint FAO/WHO Expert Consultation. Protein Quality Evaluation. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy; 1990.
14. Guillén M, Ruiz A, Cabo N, Chirinos R, Pascual G. Characterization of Sachá Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) Oil by FTIR Spectroscopy and <sup>1</sup>H NMR. Comparison with Linseed Oil. *JAACS*. 2003; 80:755-762.
15. 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 Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, Lima, 2009.
16. De Lorgeril M, Salen P, Laporte F, De Leiris J. Alpha-linoleic acid in the prevention and treatment of coronary heart disease. *European Heart Journal Supplements*. 3(Supplement D): D26-D32. 2001.
17. Harper C, Edwards M, DeFilipis A, Jacobson T. Flaxseed Oil Increases the Plasma Concentrations of Cardioprotective (n-3) Fatty Acids in Humans. *The Journal of Nutrition*. 2006; 136(1): 83-87.
18. Baylin A, Kabagambe E, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H. Adipose Tissue  $\alpha$ -linolenic acid and Nonfatal Acute Myocardial Infarction in Costa Rica. *Circulation*. 2003; 107: 1586-1591.
19. Gorriti A, Arroyo J, Quispe F, Cisneros B, Condorhuamán M, Almora Y, Chumpitaz V. Toxicidad oral a 60 días del aceite de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y linaza (*Linum usitatissimum* L.) y determinación de la dosis letal 50 en roedores. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2010; 27(3):352-60.
20. Gogus U, Smith C. -3 Omega fatty acids: a review of current knowledge. *Journal of Food Science & Technology*. 2010; 45:417-436.
21. Giménez A. Púrpura de Schölein-Henoch y estrés oxidativo. Tesis para optar el grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Facultad de Medicina, Dpto. de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Radiología, Medicina Física. Universidad de Barcelona. España, 2004.

22. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas - UNR - Rosario – Argentina. [www.biologiaosea.com.ar](http://www.biologiaosea.com.ar) © 2006-2009. Disponible en URL: <http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem20estres20oxidativo.pdf>.
23. Souki, A; Cano, C; Mengual, E; García, D; Torres, D; Almarza, J; Urdaneta, Y; León, L; Chávez, Z; Molero, E; Medina, M; Amell, A. Marcadores biológicos de estrés oxidativo: Distribución por edad y sexo de las concentraciones basales de MDA, NO y ácido úrico en niños y adolescentes de Maracaibo-Venezuela Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. 2007; 26(2):92-97.
24. Chihuailaf R, Wittwer F, Contreras P, Variaciones de la Fragilidad Osmótica Eritrocitaria en Bovinos a Pastoreo sobre praderas con bajo contenido de Selenio y Suplementados o no con Selenio. Rev. Cient. (Maracaibo) 2006; 16(3):227-231.
25. Pascual G, Molina S, Morales C, Valdivia K, Quispe F, Extracción y caracterización de aceite de diez entradas de semilla de maní (*Arachis hypogea* L.) y elaboración de maní bañado con chocolate. Mosaico Científico 2006; 3 (1):27-33.
26. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). AOAC official methods of analysis. Arlington, VA: AOAC. 2005.
27. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú (ITP), Laboratorio de Análisis Físicoquímico. Composición de ácidos grasos por Cromatografía de gases. ITP. Lima; 2003.
28. Winter C, *et al.* Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory Drugs. Proc Soc Exp Biol Med 1962; 111: 544-547.
29. Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. Manual del Modelos Experimentales de Farmacología. Primera Edición. Lima Perú. Publicaciones ASDIMOR. 2004:24.
30. Suarez S. Detoxificación hepática y defensa antioxidante por efecto de xenobióticos alimentarios. Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica. Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, Perú. 1995.

31. Buege IA, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-10.
32. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 2001; 5(1); 62-71.
33. Chipana Q. Guía SAS aplicado a diseños experimentales. Centro de Cómputo, Escuela de Post-Grado, UNALM, Lima; 1997. pp 40.
34. Balzarini M, Gonzales L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo J, Robledo C. InfoStat, Manual del Usuario. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina; 2008.
35. Kuklinski N. Nutrición y bromatología. Ediciones Omega S.A. Barcelona; 2003.
36. Morales J, y col. Nuevas Fuentes dietarias de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Rev. Chil Nutr*, 2012; 39 (3); 79-87.
37. Follegatti-Romero L, Piantino C, Grimaldi R, Cabral F. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *J. of Supercritical Fluids*. 2009; 49: 323-329.
38. Ángeles M. Determinación de la estabilidad del aceite crudo y semi refinado de la semilla de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) sometido a temperaturas variables de almacenamiento. Tesis para optar el Título de Ingeniero de Industrias Alimentarias, Facultad de Industrias Alimentarias, UNALM, Lima; 2002.
39. Johnson G, Fritsche K. Effect of Dietary Linoleic Acid on Marker of inflammation in Healthy persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012; 112(7): 1029-1056.
40. Saravanan P, Davidson N, Schmidt E, Calder P. Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids. *Lancet*. 2010; 375: 540-550.
41. Conforti F, Marrelli M, Carmela C, Menichini F, Valentin P, Uzunov D, Statti G, Duez P, Menichini F. Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), *in vitro* inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food Chemistry*. 2011; 129: 1413-1419.

42. Chiaradia L, Dos Santos R, Vitor C, Vieria A, Leal P, Nunes R, Calixto J, Yunes R. Synthesis and pharmacological activity of chalcones derived from 2,4,6-trimethoxyacetophenone in RAW 264.7 cells stimulated by LPS: Quantitative structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008; 16: 658-667.