Revista Electrónica de Veterinaria REDVET
ISSN 1695-7504
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet

Vol. VII, Nº 10, Octubre/2006 –
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html

Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la Boldoa purpurascens Cav.

Lic. Yannarys Hernández Ortega. MSc. Niurka Mollineda Diogo. MSc. Dulce M. González Mosquera.**
** Profesor Instructor. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Martha Abreu de las Villas". Carretera Camajuaní Km. 5 ½. Villa Clara. Cuba.
Contacto por e_mail: yannarys@uclv.edu.cu

Resumen

Se desarrollaron dos metodologías reportadas en la literatura para la extracción de los posibles taninos presentes en la planta. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de una mezcla de acetona-agua (7:3) (Metodología #2) siendo 67.5 el por ciento de extracción. Se estudió además la actividad hemolítica de las fracciones de taninos obteniéndose valores elevados, 25.81 y 3.71 %, resultado novedoso para estos metabolitos que no tienen como característica fundamental provocar hemólisis.

Palabras claves: taninos; hemólisis.

Summary

There developed two methodologies reported in the literature for the extraction of the possible present tannins in the plant. The best results were obtained by the utilization of a mixing of acetone - water (7:3) (Methodology #2) being 67.5 the per cent of extraction. The hemolytic activity of the fractions of tannins was studied. High values being obtained, 25.81 and 3.71 %, novel result for these components that they do not have as fundamental characteristic provoke hemolisis.

Key words: tannins; hemolisis.

El término hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lísis de la membrana del eritrocito que provoca la liberación de la hemoglobina. Como consecuencia se produce anemia y hemoglobinuria, posteriormente ictericia por exceso de hemoglobina transformada en pigmentos biliares.

Los taninos no se reconocen como causantes de hemólisis pero en recientes estudios se ha demostrado que algunos de ellos sí presentan propiedades hemolíticas por lo que se hace necesario la evaluación de esta actividad en aquellas plantas que los presenten. Tal es el caso de la *Boldoa purpurascens* (Nitro blanco), planta perteneciente a la familia de las Nictagináceas que se considera como un poderoso diurético, útil en las enfermedades de las vías urinarias; su eficacia es comparable con la de la sal de nitro, a la que probablemente debe sus nombre.

Revista Electrónica de Veterinaria REDVET
ISSN 1695-7504
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet

Vol. VII, Nº 10, Octubre/2006 –
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html

El presente trabajo pretende profundizar en la investigación de la *Boldoa purpurascens Cav* y de la actividad de los componentes químicos responsables de su acción. Para ello nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Aplicar métodos reportados en la literatura para la extracción de taninos en la planta seleccionada.
2. Determinar la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos de la planta.

Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en el Departamento de Farmacia de la UCLV con la colaboración del Instituto de Farmacia y Alimentos de la UH y del Instituto Finlay, durante el primer semestre del año 2005.

Preparación del material vegetal.
El material vegetal se recolectó en el suelo carbonatado de la Estación Experimental Las Antillas de la Universidad Central en los meses de septiembre a diciembre del año 2004 durante las horas tempranas de la mañana y tomando partes aéreas de la planta.

Secado y Molinado.
Se dividieron las hojas en partes pequeñas, se extendieron sobre bandejas metálicas y se secaron mediante calor artificial en estufa a una temperatura de 40°C durante 72h. Luego se molió el material vegetal seco en un molino de cuchillas Restch con tamaño de partículas de 0.75mm.

Obtención del extracto.
A partir del material vegetal seco y pulverizado se obtuvo un extracto acuoso al 10%, utilizando el método de extracción por Soxhlet y hasta agotamiento total de la droga. Este extracto se refrigeró y se protegió de la luz para no alterar la composición de metabolitos y para su posterior liofilización.

Liofilización.
Este proceso se realizó utilizando una temperatura de congelación de - 40°C durante 4h y aplicando posteriormente vacío.

Extracción de taninos.
Para la extracción de taninos se desarrollaron dos metodologías reportadas en las bibliografías consultadas.

Metodología #1.
A partir del liofilizado (20g), se realizó una extracción en Soxhlet con éter etílico y etanol varias veces. Posteriormente, el residuo en el dedal se preparó en un nuevo dedal y se fraccionó a través de una columna de sílica gel- 60 eluyendo con los solventes adecuados hasta obtener la solución de taninos.

Metodología #2.
Esta técnica se describe en la literatura como el método más idóneo para la extracción de taninos. A partir de 20g del liofilizado se realizan extracciones sucesivas con una mezcla de acetona-agua (7:3).

Ensayo de hemólisis.
Se estudió la actividad hemolítica de la solución final de taninos obtenida a partir de la Metodología #1 así como de la fracción final obtenida a partir de la Metodología #3 utilizando como patrones dos compuestos de actividad conocida: la digitonina MERCK y la Quil A (obtenida a partir de la Quilaja saponaria).

Reactivos.
- Células rojas de sangre de carneros sanos, suministrados por el CENPALAB con el certificado de salud.
- Solución salina fisiológica (SSF), frascos de 500ml de IMEFA según (NC) 26-87-2.
- Solución de Alsever.

Preparación de la solución de Alsever.
Se pesan 10.25g de dextrosa, 4g de citrato de sodio dihidratado y 2.1g de cloruro de sodio. Posteriormente se disuelven en 500ml de agua destilada y se ajusta el pH a 6.1 con ácido cítrico 1M.

Extracción de la sangre.
Se punciona la vena yugular de los carneros con una jeringuilla estéril de 10mL y se vierte la sangre en un frasco que contenga perlas de vidrio y 15mL de solución de Alsever. Se agita suavemente durante 15 min. de forma rotatoria. Se trasvasa la sangre a tubos de centrífuga plásticos y se centrífuga a 2000rpm durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante de la centrifugación se desecha y el precipitado que contiene los eritrocitos se resuspende en 300mL de SSF agitando suavemente y se centrífuga nuevamente. Esta operación se repite hasta que el sobrenadante sea traslúcido.

Preparación de la suspensión de eritrocitos.
Se mide el volumen de eritrocitos con pipeta y se diluye con solución salina fisiológica hasta obtener una suspensión de eritrocitos al 62.5%.
Para calcular la actividad hemolítica se utilizó la fórmula:

$$AH\ (\%) = Am\ /\ A\ (100\%) - A\ (0\%) * 100$$

Siendo:
AH – Actividad hemolítica.
Am – Absorbancia de la muestra.
A (100%) – Absorbancia correspondiente el 100% de hemólisis.
A (0%) – Absorbancia correspondiente el 0% de hemólisis.
El 0% de hemólisis se determina por medio de un blanco con 100 µl de SSF mientras que para determinar el 100% el blanco utilizado son 100 µl de agua destilada.

Revista Electrónica de Veterinaria REDVET
ISSN 1695-7504
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet

Vol. VII, Nº 10, Octubre/2006 –
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html

Resultados y Discusión.

Obtención del extracto acuoso.
Como resultado del proceso extractivo se obtuvo un extracto de color carmelita rojizo intenso, característica que coincide con lo reportado en estudios previos. El rendimiento del proceso fue de 63.7%, valor que demuestra las ventajas de la extracción por Soxhlet en cuanto a eficiencia y exhaustividad.

Extracción de taninos.
Después de aplicada las dos metodologías descritas para la extracción de los taninos, se obtuvieron extractos de color carmelita. De acuerdo a los por cientos de extracción el mejor resultado se obtuvo para la Metodología #2, 67.5%, lo que corrobora lo reportado en la literatura en cuanto a la eficacia de este método para la extracción de estos metabolitos. El por ciento obtenido para la Metodología #1 fue de 42.7%. Existen otros métodos reportados para la extracción de taninos que son muy eficientes pero no se aplicaron por falta de tiempo y de reactivos por lo que se dejaron propuestos para trabajos posteriores.

Ensayo de hemólisis.
Al calcular la actividad hemolítica por la fórmula propuesta se obtuvo un valor de 25.81% para la fracción F1 (Metodología #1) y 3.71% para la fracción final obtenida a partir de la Metodología #2.
Como se puede ver, los valores son bastante elevados lo cual resulta novedoso e interesante en cuanto a taninos se refiere, pues como se conoce, la actividad hemolítica no es una característica que distinga a estos compuestos. Sólo se reporta ésta para algunos galotaninos y sus derivados (como el pirogalol) cuando éstos se encuentran en concentraciones elevadas. Los resultados obtenidos demuestran un avance en el estudio de estos compuestos tan ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

Conclusiones

1. El método más idóneo para la extracción de los taninos presentes en la planta es el que utiliza una mezcla de acetona-agua en proporción 7:3.
2. Los posibles taninos presentes en la planta tienen una elevada actividad hemolítica, donde el valor más elevado corresponde a la solución de taninos obtenida a partir de la metodología #1.

Recomendaciones

1. Aislar y purificar los posibles taninos extraídos.
2. Continuar los estudios de caracterización de los taninos y de otros metabolitos presentes en la planta.
3. Cuantificar los taninos presentes en la planta.
4. De acuerdo a los resultados obtenidos para los posibles taninos de la planta en el ensayo de hemólisis, se debe realizar un estudio de adyuvantes.

Revista Electrónica de Veterinaria REDVET
ISSN 1695-7504
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet

Vol. VII, Nº 10, Octubre/2006 –
http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html

Bibliografía

1. Roig y Mesa JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Editorial Científico Técnica. 1988.
2. La medicina vegetal. Colectivo de Autores. Editorial Oriente. 1995.
3. González DM. Estudio fitoquímico y farmacológico del extracto acuoso de Boldoa purpurascens. UCLV. 2000.
4. Milián L. Estudio fitoquímico y genotóxico del extracto acuoso de la Boldoa purpurascens. Trabajo de Diploma. UCLV. 2000.
5. Miranda M; Cuellar A. Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela. 2000. Págs. 351-357.
6. URL: http://www.chromatography.co.uk/TECHNIQS/tlc/gloss.htm
7. URL: http://cal.nbc.upenn.edu/poison/plantas.htm/2004
8. URL: http://ntp_server.niehs.nih.gou/pyrogallol.htm/2004
9. Revista Fitoterapia Aplicada. Volumen 73, No4. Julio 2002.
10. Peña L. Desarrollo de una forma terminada, tabletas, a partir de la Boldoa purpurascens. UCLV. 2003.

Trabajo recibido el 31/07/05/2006, nº de referencia 100625_REDVET. Enviado por su autor principal. Publicado en REDVET® el 01/10/06.

(Copyright) 1996-2006. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®, ISSN 1695-7504 - Veterinaria.org® - Comunidad Virtual Veterinaria.org® - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org -www.veterinaria.org y REDVET® www.veterinaria.org/revistas/redvet y se cumplan los requisitos indicados en Copyright

Veterinaria Organización S.L.® (Copyright) 1996-2006 Email: info@veterinaria.org