

EFFECTO ANTIAGREGANTE PLAQUETARIO *in vivo* Y FIBRINOLÍTICO *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre)

Hilda Vanessa Díaz Porras^{a*}, César Fuertes Ruitón^a, Delia Whu Whu^b,
Bertha Jurado Teixeira^c, Mirtha Roque Alcarraz^d, Jorge Arroyo Acevedo^e.

RESUMEN

En el análisis fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton, se identificaron: taninos, flavonoides, quinonas, alcaloides y saponinas, teniendo como objetivo principal determinar el efecto del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton sobre la hemostasia; para eso se evaluó el efecto fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico a las siguientes concentraciones: 5,8; 0,29 y 0,014 mg/ml en sangre venosa humana; para el efecto antiagregante plaquetario se administró 25, 50 y 100 mg/kg del extracto a 40 ratas albinas hembras, las que se dividieron en 5 grupos de 8 animales cada uno. Al grupo control se administró suero fisiológico 5 ml/kg y se utilizó aspirina 100 mg/kg, como fármaco estándar; se determinó el tiempo de protrombina y tiempo de coagulación, obteniéndose mayor efecto a 50 mg/kg al variar en 8% ($p < 0,000$) y 45% ($p < 0,001$), respectivamente.

Palabras clave: *Oenothera rosea*, fibrinolítico, antiagregante plaquetario, flavonoides.

ANTIPLATELET EFFECT *in vivo* AND FIBRINOLYTIC *in vitro* ETHANOL EXTRACT LEAVES *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre)

ABSTRACT

The phytochemical analysis of the ethanol extract of the leaves of *Oenothera rosea* Aiton were identified: tannins, flavonoids, quinones, alkaloids and saponins, the main objective to determine the effect of ethanol extract of the leaves of *Oenothera rosea* Aiton on hemostasis, to that was evaluated the *in vitro* fibrinolytic effect of ethanol extract at the following concentrations: 5.8, 0.29 and 0.014 mg/ml human venous blood to the antiplatelet effect was given 25, 50 and 100 mg/kg of extract 40 female albino rats, which were divided into 5 groups of 8 animals each. The control group was administered saline 5 ml/kg and used aspirin 100 mg/kg, as standard drug, we determined the prothrombin time and clotting time obtaining greater effect than 50 mg/kg to vary by 8% ($p < 0.000$) and 45% ($p < 0.001$) respectively.

Key words: *Oenothera rosea*, fibrinolytic, antiplatelet effect, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los países más destacados en diversidad biológica; existen alrededor de 25,000 especies de plantas medicinales, mucha de las cuales poseen propiedades

^{a*} Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara". U.N.M.S.M.

^b Laboratorio de Química Instrumental. U.N.M.S.M.

^c Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional. U.N.M.S.M.

^d Laboratorio de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.N.M.S.M.

^e Laboratorio de Farmacología. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú. E- mail: vanessadiaz646@hotmail.com.

terapéuticas. La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia del rol que desempeña el uso y utilización de las plantas medicinales en la “Atención Primaria de la salud”; recomienda y respalda su integración en los sistemas nacionales de salud; estima que casi el 80% de todos los habitantes de la Tierra los usan para resolver sus principales problemas de salud ¹. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares, como el infarto al miocardio y accidente cerebro vascular, cobran 17,5 millones de vidas al año en el mundo y tienen como causa principal la trombosis o coagulación sanguínea en el interior de las arterias para producir estas enfermedades; entre otras. Para su tratamiento se dispone de varios grupos de medicamentos, denominados en conjunto como anticoagulantes; entre éstos se encuentran: antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes orales y trombolíticos. Entre los antiagregantes plaquetarios reconocidos tenemos la Aspirina, pero produce inflamación gástrica como efecto adverso principal. *Oenothera rosea* Aiton es conocida vulgarmente como chupasangre en la medicina tradicional peruana; es utilizada para diferentes tratamientos como: antiinflamatorio, para la neumonía, tuberculosis pulmonar, gonorrea y para nuestro interés, en hinchazones por su uso para absorber la sangre de los hematomas provocados por golpes y contusiones ².

PARTE EXPERIMENTAL

Las hojas de *Oenothera rosea* Aiton se colectaron en la comunidad campesina de San José de Huaylahichan, distrito de Acobamba, provincia de Tarma, departamento de Junín en el mes de abril del 2010

Preparación del extracto etanólico de hojas de *Oenothera rosea* Aiton

Doscientos veintiocho gramos de las hojas secadas y molidas de *Oenothera rosea* Aiton fueron macerados con 1400 ml de etanol 96% por 7 días con constante agitación y protegido de la luz en un frasco de color ámbar de boca ancha, el macerado fue filtrado sobre papel filtro; la solución extraída se guardó en un recipiente de vidrio de 5 L de capacidad. Una segunda maceración se realizó en las condiciones antes señaladas; se filtró y la solución extraída se adicionó al recipiente de vidrio de la primera maceración. Las soluciones filtradas se sometieron a evaporación en el evaporador rotatorio con baño María de 60 °C, obteniéndose treinta y dos gramos de extracto etanólico.

Estudio fitoquímico

Ensayos preliminares

Con la finalidad de detectar los diferentes constituyentes químicos del extracto etanólico desecado, se emplearon los siguientes ensayos:

Ensayos físicos

Marcha de solubilidades

En una batería de tubos de ensayo se colocó el extracto etanólico seco de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton y se le agregó 2 ml del solvente en el siguiente orden: n-hexano, éter de petróleo, benceno, acetona, cloroformo, acetato de etilo, 1-butanol, metanol, etanol y agua destilada.

Screening fitoquímico

Ensayos de coloración

Se han realizado pruebas de color a través de reacciones cromogénicas, en tubos de ensayo para determinar los metabolitos primarios y secundarios más importantes, mediante la marcha fitoquímica preliminar.^{3,4}

Análisis cromatográfico.

Se realizó sobre papel Whatman N° 1, cuya medida fue de 11 cm de ancho x 60 cm de largo; como fase móvil se usó BAA (1-butanol - ácido acético - agua, 4: 1: 5). Los cromatogramas obtenidos fueron examinados con luz UV y NH_3 / UV; cada banda fue cortada y eluida con metanol y analizada mediante la reacción de Shinoda; asimismo, se observó los desplazamientos de los máximos de absorción al agregar: MeONa, NaAcO, NaAcO/ H_3BO_3 , AlCl_3 y AlCl_3/HCl a la solución metanólica de la banda con mayor concentración⁵, haciendo uso de un espectrofotómetro UV-visible.

Prueba preliminar del efecto fibrinolítico *in vitro* de los flavonoides del extracto etanólico seco de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre)

Procedimiento: Se usó el método descrito por Prasad⁶, se hizo un ensayo como piloto con sangre venosa humana, proveniente de personas que no consumen anticonceptivos ni anticoagulantes, se pesaron inicialmente los tubos Eppendorf, se agregó 500 μl de sangre y se puso en la estufa a 37 °C por 45 minutos; una vez formado el coágulo, se retiró todo el suero de la muestra por aspiración con micropipeta sin alterar el coágulo formado, se pesó nuevamente y se obtuvo por diferencia el peso del coágulo seco. Cada tubo Eppendorf que contuvo el coágulo se rotuló debidamente y se agregó 500 μl de la solución metanólica que contenían los flavonoides; nuevamente se pusieron en la estufa a 37 °C por 90 minutos. Finalmente, se removió el líquido de los tubos y se pesaron.

Efecto fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico seco de *Oenothera rosea* Aiton

Se usó el método descrito por Prasad⁶, se trabajó con sangre venosa de 10 personas voluntarias, cuya edad promedio fue de 24 años, quienes nunca consumieron anticonceptivos ni anticoagulantes. Se pesaron inicialmente los tubos Eppendorf; se agregó 500 μl de sangre y se pusieron en la estufa a 37 °C por 45 minutos; una vez formado el coágulo, se retiró todo el suero de la muestra por aspiración con micropipeta sin alterar el coágulo formado; se pesó nuevamente y se obtuvo por diferencia el peso del coágulo seco. Cada tubo Eppendorf se rotuló debidamente y se agregó 500 μl del extracto etanólico seco a la concentración de 5,8 mg/ml previamente reconstituido en etanol al 96°; con el mismo procedimiento se trabajaron las concentraciones 0,29 y 0,014 mg/ml; nuevamente se colocaron en la estufa a 37 °C por 90 minutos. Finalmente, se removió el líquido de los tubos y se pesaron. La prueba se repitió por triplicado, con un total de 90 tubos Eppendorf.

Efecto antiagregante plaquetario *in vivo* del extracto etanólico seco de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton

Siguiendo el método de CYTED⁷ para la actividad antiagregante plaquetario, se utilizaron 40 ratas albinas hembras cuyo peso fue 210 ± 4 g las que fueron divididas en 5 grupos de 8 animales cada uno.

Grupo control: Se administró 5 ml/kg de suero fisiológico 5 ml/kg dos veces al día.

1er. grupo experimental: Se administró 25 mg/kg del extracto de chupasangre dos veces al día.

2do. grupo experimental: Se administró 50 mg/kg del extracto de chupasangre dos veces al día.

3er. grupo experimental: Se administró 100 mg/kg del extracto de chupasangre dos veces al día.

Grupo estándar farmacológico: Se administró 100 mg/kg de aspirina dos veces al día.

Análisis estadístico

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en valores medios \pm error estándar, en un intervalo de confianza del 95%. Se ha tenido en cuenta una $p < 0,05$ para considerar significativos los hallazgos. Se aplicó el análisis de varianza para establecer la significancia estadística del tratamiento. Se utilizó el programa estadístico SPSS, versión 13, año 2006; asimismo, los programas Word y Excel 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis fitoquímico

El extracto etanólico de las hojas de *O. rosea* fue sometido al ensayo de solubilidad; para lo cual se hizo uso de un grupo de solventes ordenados de acuerdo a su polaridad (tabla 1).

Tabla 1. Prueba de solubilidad

SOLVENTES	RESULTADOS
n - hexano	-
Éter de petróleo	-
Benceno	-
Acetona	+
Cloroformo	++
Acetato de etilo	++
1- utanbl	++
Metanol	+++
Etanol	+++
Agua destilada	++

+ Es soluble - No es soluble

Screening fitoquímico

Se determinó la presencia de taninos, saponinas, flavonoides, quinonas y alcaloides. Los datos coinciden con los obtenidos por Gonzales y cols⁸, quienes realizaron un estudio fitoquímico comparativo entre *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis*; sin embargo, los resultados reportados para *Oenothera multicaulis* coinciden con *Oenothera rosea* Aiton, planta estudiada en este trabajo de investigación; destacando que *Oenothera multicaulis* reporta también alcaloides y saponinas (tabla 2).

Tabla 2. Screening fitoquímico del extracto etanólico

Constituyente químico	Reactivo	Resultado	Calificación
Carbohidratos	R. Molish	Anillo en zona color violeta	+++
Fenoles	R. Cloruro de hierro (III)	Precipitado azul	++++
Taninos	R. gelatina	Precipitado blanco	+++
Aminoácidos y grupos aminas	R. Ninhidrina	Precipitado blanco	-

sigue ...

viene ...

Flavonoides	R. Shinoda	Coloración ligeramente rojizo	++
Quinonas	R. Borntranger	Coloración rojo	+++
Alcaloides	R. Dragendorff	Precipitado ligeramente rojizo	++
Alcaloides	R. Mayer	Precipitado blanco	++
Leucoantocianidinas	R. Rosenheim	Precipitado ligeramente naranja	+
Grupo carbonilo	R. Hidroxilamina	No se forma abundante precipitado	+
Glicósidos	R. Vainillina - sulfúrica	La formación de anillos coloreados	++
Saponinas		Producción de 0,5 cm de espuma estable por 10 minutos	+++
Esteroides libres o triterpenoides	R. Lieberman Burchardt	Coloración verde	+++

+ Reacción positiva - Reacción negativa

Análisis cromatográfico en papel (CP)

Los flavonoides fueron analizados y fraccionados por cromatografía en papel, en un sistema descendente; se obtuvo 16 fracciones de flavonoides, cuyas propiedades fluorescentes fueron analizadas en la lámpara de luz UV con y sin vapores de amoníaco, seguida de la reacción de Shinoda y su lectura en el espectrofotómetro UV - Visible (tabla 3).

Tabla 3. Análisis de las bandas cromatográficas en papel eluidas con metanol y caracterizadas por espectrofotometría UV / Visible

Eluatos de las fracciones obtenidas por cromatografía en papel		Con NH ₃ en la lámpara de luz UV	Shinoda	Bandas espectrales UV	
Fracción N°	Color en la lámpara UV			Banda I	Banda II
1	Celeste débil	No cambia	--	--	--
2	Púrpura	No cambia	--	362	272
3	Amarillo	Intensificó	--	356	258
4	Púrpura	No cambia	--	365	272

sigue ...

viene ...

5	Amarillo fluorescente	Intensificó	--	353	257
6	Púrpura intenso	No cambia	--	355	259
7	Amarillo débil	Lila claro	--	361	266
8	Púrpura claro	Celeste claro	--	364	260
9	Púrpura intenso	Verde claro	Lila claro	360	259
10	Púrpura azulado	Celeste claro intenso	Melón	345	260
11	Púrpura oscuro	Verde muy intenso	Rosado intenso	362	259
12	Amarillo	Rosado	Melón	362	258
13	Púrpura claro	No cambia	--	358	258
14	Púrpura intenso	Celeste claro+++	--	--	--
15	Púrpura claro	Celeste claro ++	Amarillo	--	--
16	Rojo naranja	Intensificó	Amarillo	--	--

Con la finalidad de obtener la posible estructura del flavonoide responsable de la actividad farmacológica, se realizó una prueba preliminar donde se detectó que la fracción 9 fue la que presentó mayor actividad en la prueba piloto; estos ensayos fueron complementados con las reacciones de desplazamiento⁹. Al tratarlo con metóxido de sodio hubo un efecto batocrómico de 14 nm (tabla 4), lo que nos indicaría que el compuesto tiene hidroxilos libres, principalmente en la posición 4'; al hacer reaccionar con tricloruro de aluminio se formó un complejo fuerte entre el carbonilo y el oxidrilo de la posición del C- 5; al agregarle el HCl el complejo formado no se descompuso, lo que indicó la presencia de un oxidrilo en el C – 5, cuyo esqueleto básico correspondería al de una flavona; por consiguiente se propone la estructura siguiente (figura 1):

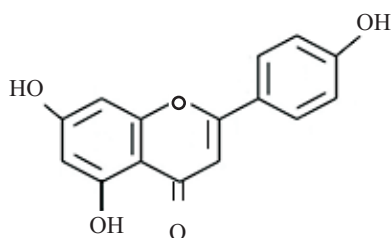


Figura 1. 4'- 5, 7 trihidroxiflavona

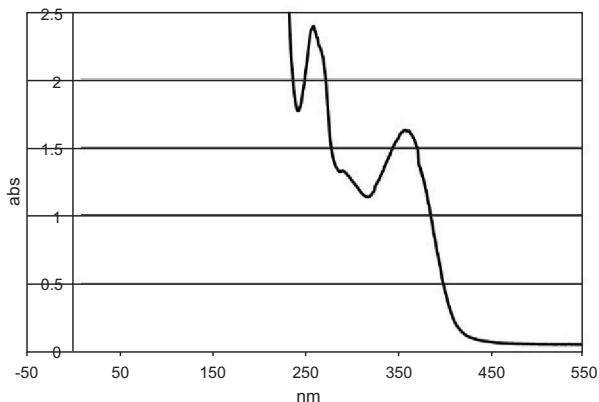


Figura 2. Espectro UV / Visible del flavonoide de la fracción 9 del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton

Tabla 4. Comportamiento de la fracción 9 frente a los reactivos de desplazamiento para determinar las características estructurales del flavonoide.

Extracto	Fracción	Pico	Lectura de picos Las bandas de absorción en nm por efecto de los reactivos de desplazamiento					
			λ_{MeOH}	$\lambda_{\text{MeOH} + \text{MeONa}}$	$\lambda_{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3}$	$\lambda_{\text{MeOH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}}$	$\lambda_{\text{MeOH} + \text{ACONa}}$	$\lambda_{\text{MeOH} + \text{ACONa} + \text{H}_3\text{BO}_3}$
Extracto etanólico de hojas de <i>Oenothera rosea</i> Aiton	9	1	360	403	367	358	382	376
		2	258	272	265	267	266	263

Cuantificación de flavonoides

Se obtuvo 58,25 mg de flavonoides totales por 1 gramo de extracto etanólico seco de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton

Efecto fibrinolítico *in vitro* de los flavonoides del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton

Según el método señalado por Prasat y cols⁶, para el efecto fibrinolítico *in vitro* se utilizó estreptoquinasa; ésta es un agente fibrinolítico demostrado¹⁰; se adicionó un tampón fosfato salino, debido a que la estreptoquinasa es una proteína, que para su funcionamiento es imprescindible el mantenimiento del pH; las diluciones fueron realizadas con agua estéril (figura 3).

Para el estudio del efecto fibrinolítico *in vitro* el extracto etanólico se diluyó en alcohol de 96°; a las concentraciones 5,8; 0,29 y 0,014 mg/ml, además del blanco y el control: se observó la actividad fibrinolítica del flavonoide sometido a la prueba piloto. (figura 4).

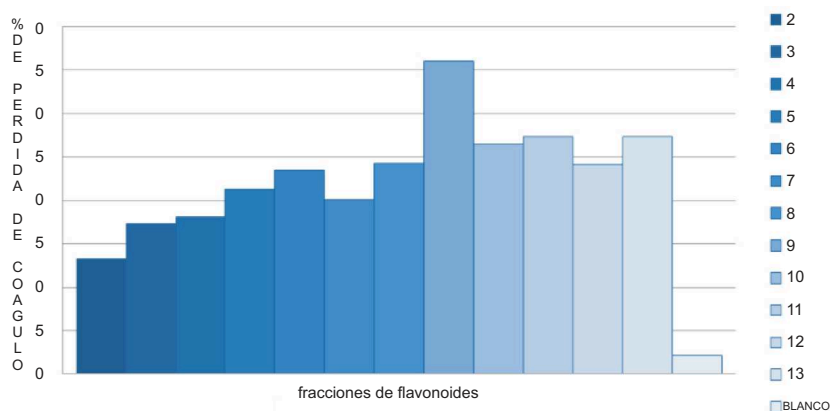


Figura 3. Prueba preliminar del efecto fibrinolítico de los flavonoides de *Oenothera rosea* Aiton

Del efecto fibrinolítico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton

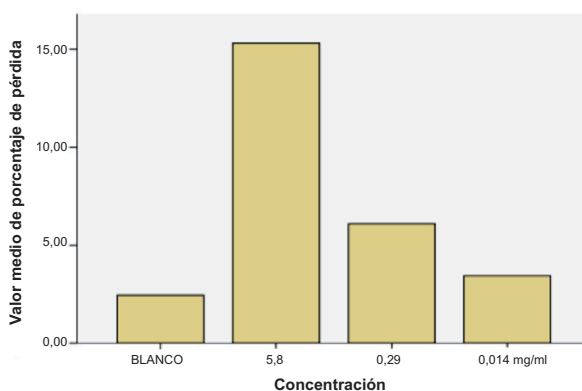


Figura 4. Efecto fibrinolítico *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre)

Efecto antiagregante plaquetario *in vivo* del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton

Posiblemente los flavonoides contenidos en el extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton son los responsables de la actividad antiagregante plaquetario, por la inhibición de la formación de tromboxano¹¹; nos basamos en la información proporcionada por Álvarez y cols¹², que hizo un estudio de la acción cardiovascular y sanguínea de los flavonoides, citando en su publicación que los flavonoides bloquean la ruta del ácido araquidónico, por inhibición de la ciclooxigenasa y/o lipoxigenasa, o el impedimento de la formación del tromboxano y el antagonismo sobre su receptor; esta información concuerda con Triboli y cols¹³

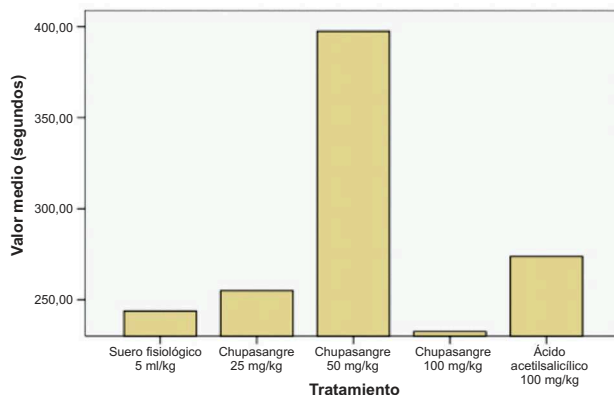


Figura 5. Efecto del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton sobre el tiempo de coagulación.

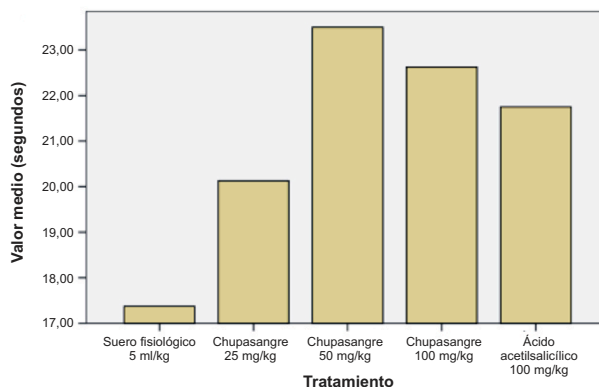


Figura 6. Efecto del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton sobre el tiempo de protrombina.

CONCLUSIONES

- El estudio fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre) indica la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, quinonas y saponinas, entre los metabolitos más importantes. Se encontró flavonoides en una concentración de 58,25 mg por gramo de extracto; el principal flavonoide tiene una estructura general que responde a la estructura 4',5, 7- trihidroxiflavona, la cual parece ser la responsable de la actividad fibrinolítica *in vitro*.
- Se demostró el efecto antiagregante plaquetario *in vivo* del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre) al haber diferencia significativa en 8 % ($p < 0,000$) para la prueba de tiempo de protrombina y 45% para la prueba de tiempo de coagulación ($p < 0,001$) comparado con la aspirina que fue usada como fármaco estándar.
- Se demostró el efecto fibrinolítico *in vitro* al lisar los coágulos formados en sangre de voluntarios sanos, con el extracto etanólico de *Oenothera rosea* Aiton, a la concentración de 5,8 mg/ml.

AGRADECIMIENTO

- Nuestro profundo agradecimiento al Dr. José Juárez Eyzaguirre, profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por sus consejos, asesoría y orientación brindada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tanigushi S.; Imayoshi Y.; Yazaki K.; Yoshida T. Hydrolysable Tannin Production in *Oenothera tetraptera* Shoot Tissue Culture. *Plant Biotechnology* 2002; 19(5): 357-363.
2. Soria R. Estudio farmacobotánico de *Oenothera multicaulis* R&P. Tesis de Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos - UNMSM, Lima, 1988.
3. Lock, O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Primera edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica. Lima, 1994.
4. Gorriti, A.; Jurado, B.; Quispe, F. Manual de Laboratorio I y II. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Lima. 2004.
5. Cruz, S. Estudio Químico de *Dioon Edule*. 1984. Disponible en: <http://148.206.53.231/UAM20875.PDF>
6. Prasad S.; Kashyap R.; Deopujari J.; Purohit H.; Taori G.; Dagainawalo H. Development of an *in vitro* model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. *Thrombosis Journal* 2006; 14(4): 1-4
7. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Actividad antiagregante plaquetario. CYTED, Santafé de Bogotá, 1995.
8. Gonzales J.; Lechuga A.; Serrano C. Estudio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (Yawar chonq'a). *Rev. Situa* 2000; 9(17): 66-76.
9. Mabry T.; Markham K.; Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin: Springer - Verlag; 1970.
10. Herrera L.; Marrero A. Estreptoquinasa: a propósito de un agente trombolítico patentado en Cuba. *Biotechnología Aplicada* 2005; 22(1):182-190.
11. García M.; Armenteros D.; Vilas M.; Coma C.; Hernández J.; Díaz A.; Fernández J. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Revista Cubana de Angiología y Cirugía vascular* 2002; 3(2): 39-46.
12. Álvarez E.; Orallo F. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *OFFARM* 2003; 22(11): 102-109.
13. Triboli D.; Valter G.; Naccari G. Combinación de catequina y la quercetina para su empleo farmacéutico o alimenticio. Madrid. Disponible en: http://www.espatentes.com/pdf/2238495_t3.pdf.