

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE “in vitro” DEL EXTRACTO TOTAL EN ETANOL Y FRACCIONES DE LA CORTEZA DE *Brownea ariza* Bentham (CAESALPINIACEAE)

Rita Márquez Vizcaíno*, Catalino De La Rosa**, Emilio José Arrieta García*, Juan Villalba Uparela*

*Grupo de Investigación Fitoquímica Universidad de Sucre Departamento de Biología. Facultad de Educación y Ciencias.

**Grupo de Investigación Fitoquímica, Departamento de Química, Universidad del Atlántico, Km 7 antigua vía a Puerto Colombia, A.A. 1890, Barranquilla, Colombia

* fitorita@yahoo.es ; **cdelarosa@uniatlántico.edu.co

Resumen. *Brownea ariza* Bentham (Caesalpinaceae) es conocido popularmente por sus propiedades hemostáticas. Debido a la escasa información científica de esta planta, se decidió realizar una investigación experimental considerando a la posible actividad coagulante que presentaron extractos obtenidos a partir de la corteza. Se obtuvo, primeramente, un extracto total en Etanol, mediante extracción por maceración y seguidamente, se fraccionó una parte de éste obteniéndose fracciones por medio de cromatografía en columna, las cuales por previa concentración a presión reducida y total eliminación del solvente, se prepararon cinco concentraciones (variable dependiente) a partir de una inicial de 500mg/mL . Estas fueron ensayadas con la técnica Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada, reemplazando, inicialmente, el reactivo de Tromboplastina y luego, el CaCl_2 $0,025\text{M}$. en este caso se evidenció solidificación en Plasma Pobre en Plaquetas una vez usados el Extracto Total, Fracción cuatro y Fracción cinco registrando el tiempo (Variable independiente) en segundos. Los datos anotados fueron sometidos a un análisis de correlación y regresión lineal de acuerdo a las variables ensayadas, concluyéndose que dichas correlaciones estuvieron cerca de 1 y -1 , siendo significativas tomando α de 0,20 para el Extracto total en Etanol, 0,10 para Fracción cuatro y 0,05 para Fracción cinco. Las gráficas de regresión lineal mostraron puntos cercanos a dicha línea y el ANOVA mostró valores relativamente bajos con respecto al α seleccionado (0,05) aceptándose que las medias de las tres poblaciones eran iguales.

Palabras Claves: *Brownea ariza*, coagulación, extractos, Plasma Pobre en Plaquetas, Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada.

Abstract. *Brownea ariza* Bentham (Caesalpinaceae) it is known popularly by their hemostatic properties. Due to the scarce scientific information of this plant, was decided to carry out such an experimental investigation considered the possible clotting activity that what were presented extracts obtained starting from the bark. It was obtained, firstly, a total extract in Ethanol, by means of extraction for maceration and subsequently, a part was fractioned of

this obtaining you fractions by means of chromatografy in column, those which for previous concentration to pressure reduced and total elimination of the solvent, they got ready five concentrations (dependent variable) starting from an initial of 500 mg/mL. These were rehearsed with the technical Activated Tromboplastine Partial Time, replacing, initially, the reagent of Tromboplastine and then, the C_aCl_2 0,025M. in this case solidification was evidenced once in Platelets Poor Plasma used the Total Extract, Fraction four and Fraction five registering the time (independent Variable) in seconds. The logged data were subjected to a correlation analysis and lineal regression according to the rehearsed variables, being concluded that this correlations were near 1 and -1, being significant taking of α 0,20 for the total extract in ethanol, 0,10 for Fraction four and 0,05 for Fraction five. Likewise, the graphs of lineal regression showed near points to this line and the ANOVA showed relatively low values with regard to the selected α (0,05) being accepted that the stockings of the three populations were same.

Key-Words: *Brownea ariza*, clotting, extracts, Platelets Poor Plasma, Activated Tromboplastine Partial Time.

1. Introducción

Brownea ariza Bentham, incluida en el orden de las leguminales y en la familia caesalpiniaceae [1], es un árbol de copa redondeada de alrededor de 9 metros de alto, cuyas hojas son alternas paripinnadas e inflorescencias en racimos semiesféricos que pueden ser axilares o terminales; la legumbre que presenta es comprimida de un largo de 14 a 18 cm.aproximadamente [2,3]. Este árbol maderable, posee propiedades medicinales tales como laxantes y hemostáticas, siendo popularmente utilizado en casos de hemorragias internas y heridas sangrantes [3,4].

La hemostasia es entendida como el conjunto de mecanismos que permiten un equilibrio dinámico entre todos los procesos bioquímicos que mantienen la fluidez de la sangre y la integridad vascular [5,6]. Cualquier alteración en dicho proceso es causa de coagulopatias, ejemplo de ello la coagulación intravascular diseminada (CID), e incluso, podrían desatarse eventos de señalización celular pro-inflamatorios mediados por receptores en la superficie plaquetaria activados por proteasas (PAR) o por la liberación de citocinas (IL-6 e IL-8) [7,8]. De igual forma, la coagulación sanguínea (que es solo un paso del proceso hemostático) se inicia una vez es lesionado cualquier tejido, impidiéndose la salida de sangre gracias al trombo formado por medio del fibrinógeno activado o fibrina. La generación de esta última puede darse mediante 3 etapas: la primera de ellas, generando protrombinasa, la cual es el complejo activador de la protrombina gracias a activaciones sucesivas de varios factores de la coagulación, ya sea por la vía intrínseca o la vía extrínseca; la segunda, generando trombina y finalmente, que es cuando ocurre la formación de la fibrina [5,6].

Debido a la escasa información registrada acerca de *Brownea ariza* Bentham, se realizó esta investigación de tipo experimental, evaluando la posible actividad coagulante de los extractos en plasma pobre en plaquetas (PPP) por medio de la técnica conocida como tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) (tiempo de referencia 33–48 segundos), la cual evalúa el proceso de coagulación por medio de la vía intrínseca a partir del tiempo registrado en la formación del coágulo de fibrina “in vitro”.

2. Materiales, Métodos y Experimentos

La investigación realizada es de tipo experimental, intentándose evaluar la posible actividad coagulante de extractos vegetales.

2.1. Material Vegetal Empleado

La especie en estudio actualmente se encuentra en proceso de reidentificación en el Instituto de Ciencias Naturales del Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia.

Se trabajó con 835 g. de cortezas en buen estado (secas y trituradas) de *Brownea ariza* Bentham, las cuales fueron sometidas a extracción mediante maceración durante 4 días, obteniéndose alrededor de 163,5 g. (rendimiento del 19,58%) del Extracto Total en Etanol.

2.2. Fraccionamiento en Columna Flash

15 g. del extracto total fueron fraccionados mediante columna flash utilizando como fase estacionaria sílica 60GF₂₅₄ [9] y como fase móvil (éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol) obteniéndose cinco fracciones codificadas como F1, F2, F3, F4, y F5 las cuales se sometieron a concentración a presión reducida en rota evaporador y en una campana de vacío para eliminar totalmente el solvente orgánico.

2.3. Pruebas de Coagulación

Se llevó a cabo la técnica conocida como tiempo de Tromboplastina parcial activada (TTPA) usando el kit distribuido por Wiener Lab. [10].

2.3.1. Obtención de Plasma Pobre en Plaquetas

Las pruebas se realizaron en plasma obtenido de sangre extraída de 3 pacientes sanos, no fumadores y sin ninguna dependencia de drogas. El anticoagulante usado fue Citrato de sodio al 3,8%. La sangre citratada, se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 minutos, recuperándose el Plasma Pobre en Plaquetas.

2.3.2. Preparación de las Concentraciones

Se preparó el extracto y las fracciones a una concentración de 500 mg/mL usando como vehículo solución salina, para determinar cual extracto y fracción presentaba reacción de coagulación sobre Plasma Pobre en Plaquetas.

Conociendo los extractos con los que se presentó enturbiamiento y/o solidificación en el plasma, se prepararon concentración de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL.

2.3.3. Controles (Testigos)

Para la técnica Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada se emplearon como controles positivos el reactivo de Tromboplastina parcial activada y el Cloruro de Calcio ($CaCl_2$) 0,025 M. y como control negativo solución salina, que por ser isotónica con respecto al plasma no altera o activa los factores implicados en el proceso de la coagulación sanguínea.

2.3.4. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se basó en un análisis de correlación (incluyendo la estadística de prueba *t*) y de regresión lineal y, un análisis de varianza (ANOVA) para tamaños de muestras iguales, con el fin de establecer la correlación existente entre las dos variables sometidas a experimentación y la capacidad de darse la reacción de formación del coágulo de fibrina de manera similar en muestras de plasma obtenida de sangre extraída de 3 pacientes.

3. Resultados y Discusión

Al reemplazar el reactivo de TPA, no se evidenció cualquiera de las dos características a considerarse como positivas en la reacción de coagulación “in vitro” (enturbiamiento y/o solidificación), lo cual resulta lógico si se tiene en cuenta que dicha reacción no tendrá lugar mientras no esté participando la tromboplastina parcial en presencia de calcio iónico.

Reemplazado el $CaCl_2$ por la concentraciones de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL, del extracto total, F4 y F5 se evidenció reacción de formación del coágulo de fibrina en las muestras de plasma. Los resultados de la prueba biológica se indican en la Tabla 1.

La prueba se realizó por duplicado, cuya diferencia no sobrepasaba el 5%, siendo los datos aceptados por la mínima variación presentada entre ellos. El análisis de correlación lineal entre las dos variables sometidas a experimentación, demostraron una correlación lineal cercana a 1 y -1, según se indica en la Tabla 2. siendo significativas las correlaciones, empleando una prueba de hipótesis formal basada en la estadística de prueba *t* con valores de α específicos para el extracto y fracciones (0,20 para el Extracto Total; 0,10 para Fracción cuatro y, 0,05 para Fracción cinco).rechazándose la hipótesis nula acerca de no haber correlación lineal significativa, ya que los resultados corroboran la afirmación de

una correlación entre el tiempo y la concentración requeridos para la formación del coágulo de fibrina “*in vitro*”.

Tabla 1.

Resultado de la técnica TTPA reemplazando el CaCl_2 , indicándose los tiempos (promedios) en segundos de cada paciente usando las concentraciones en mg/mL del Extracto Total, Fracción cuatro y Fracción cinco.

Muestra	Concen- tración (mg/mL)	Tiempo (s) Paciente 1	Tiempo (s) Paciente 2	Tiempo (s) Paciente 3
Extracto Total en E tan ol	500	16,04	16,07	15,78
	250	30,93	30,81	32,24
	50	31,78	29,75	29,24
	10	31,49	29,56	29,83
	1	32,12	30,02	29,48
Fracción cuatro	500	32,20	37,31	34,61
	250	41,11	43,97	40,18
	50	44,38	49,44	44,14
	10	50,4	55,92	53,58
	1	56,9	59,84	59,04
Fracción cinco	500	82,5	61,5	50,16
	250	64	46,8	50,5
	50	40,69	36,42	38,86
	10	36,47	31,83	33,23
	1	33,85	32,40	30,59

El análisis de regresión lineal, mostró gráficas con puntos muy próximos a la línea de regresión y errores estándar estimados muy bajos, lo cual sugiere un comportamiento un tanto ideal en función de dicha línea (Figuras 1,2,3); con respecto al tiempo registrado con el control positivo, se observó solidificación en el Plasma Pobre en Plaquetas utilizando la concentración mas alta del extracto Total a un tiempo muy inferior y con la Fracción cuatro se dio la reacción dentro de los lapsos citados por la literatura (33 -48 segundos), siendo el comportamiento de éstos en forma inversa proporcional a la concentración. Las concentraciones de la Fracción cinco mostraron un comportamiento diferente, ya que la reacción se presentó en forma directa proporcional a la concentración, resultado que es sorprendente puesto que se esperaría un comportamiento un tanto similar a los mencionados y, desde el punto de vista farmacológico es interesante, ya que se presenta la formación del coágulo de fibrina utilizando la concentración mínima 1 mg/mL en un tiempo de 33,85 segundos cercano al citado en la literatura que es de 33 a 48 segundos.

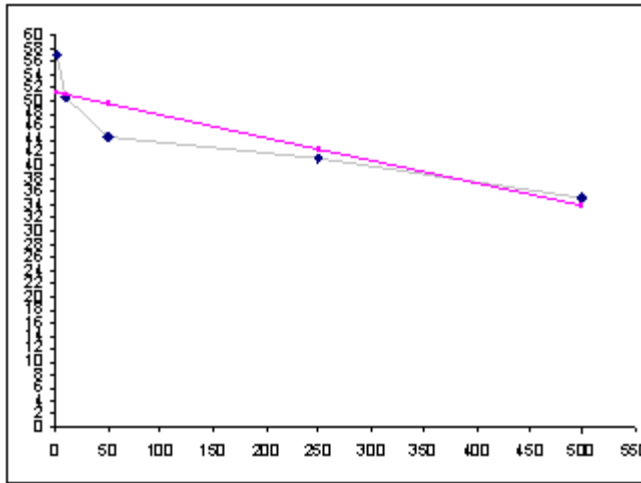


Figura 1: Gráfica indicando las líneas de regresión en paciente P_1 *Ex. Total*. en eje horizontal se muestra la variable independiente (concentración en mg/mL) y en el eje vertical la variable dependiente (tiempo en segundos). Nótese la cercanía de los datos a la línea de regresión y *Ex. Total* en forma directamente proporcional a la concentración.

Tabla 2

Correlación registrada en cada paciente usando el Extracto Total, Fracción cuatro y Fracción cinco.

Muestras	Correlación (r)		
	P_1	P_2	P_3
Extractototal	-0,905	-0,85	-0,785
Fracción cuatro	-0,881	-0,934	-0,871
Fracción cinco	0,993	0,998	0,881

En el análisis de varianza (ANOVA) para tamaños de muestras iguales comparando los valores medios de los tres pacientes, el nivel de α utilizado fue 0,05, demostrándose que existían suficientes indicios para justificar que se aceptara la afirmación de que las tres muestras provenían de poblaciones cuyas medias eran iguales, puesto que el valor del estadístico de prueba fue inferior en todos los casos al nivel de α ensayado.

Se sabe que el calcio es fundamental para que ocurra la activación de los factores implicados en la activación de la protrombina en el proceso de formación de la fibrina [5, 6]. Al reemplazar el $CaCl_2$ por las concentraciones ensayadas, los resultados obtenidos muestran que los metabolitos secundarios presentes en los extractos potencian el proceso de la coagulación mediante la vía intrínseca

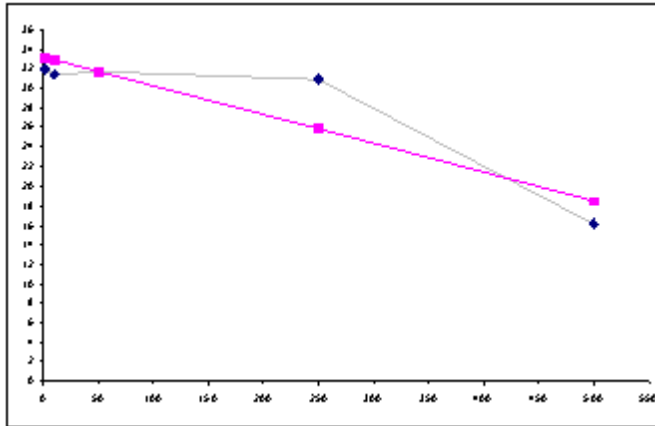


Figura 2: Gráfica indicando las líneas de regresión en paciente P_1 F_4 . En eje horizontal se muestra la variable independiente (concentración en mg/mL) y en el eje vertical la variable dependiente (tiempo en segundos). Nótese la cercanía de los datos a la línea de regresión y F_4 en forma directamente proporcional a la concentración.

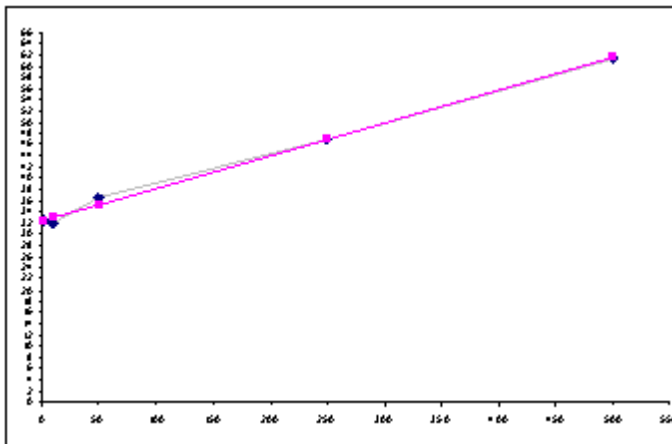


Figura 3: Gráfica indicando las líneas de regresión en paciente P_2 F_5 . En eje horizontal se muestra la variable independiente (concentración en mg/mL) y en el eje vertical la variable dependiente (tiempo en segundos). Nótese la cercanía de los datos a la línea de regresión y F_5 en forma inversamente proporcional a la concentración.

cuyo efecto en el Plasma Pobre en Plaquetas es notorio; sin embargo, “*in vivo*” se llevan a cabo diversas reacciones dentro del proceso hemostático que necesariamente dependen de una concentración adecuada de Calcio, los resultados obtenidos de la técnica aplicada muestran que las concentraciones ensayadas del Extracto Total y fracciones cuatro y cinco de corteza de *B. ariza* Bentham, potencian la activación de los factores implicados en el proceso de la coagulación sanguínea mediados por el calcio.

Agradecimientos a Nelly Pacheco Mercado (Bacterióloga) y Md. Graciela Herrera por la valiosa asesorías durante la realización de la prueba biológica.

Referencias

- [1] Strasburger A., Tratado de Botánica, 6^o. ed. Barcelona, María S.A.; 1974.
- [2] Gupta M. 270 plantas medicinales iberoamericanas, 1^a. ed. Bogotá, Editores Presencia Ltda.; 1995.
- [3] García H. Flora medicinal de Colombia, 2^a ed. Bogotá, Tercer Mundo Editores; 1992.
- [4] Encuesta Etnobotánica realizada por los autores.
- [5] Casas A., et al. Laboratorio Clínico Hematología. 1^a ed. Madrid, Mc Graw Hill – Interamericana; 1994.
- [6] Forero Y, Forero A. Manual de procedimientos en coagulación, 1^a ed. Bogotá, Publicaciones INS; 1998.
- [7] Riewald M, Ruf W. Mechanistic coupling of protease signalling and initiation of coagulation by tissue factor. PNAS, 2001; 98:7742-7747.
- [8] De Jonje et al. Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects. Clin. Diagn. Lab. Immunol, 2003; 10:495-497.
- [9] Pasto D, Johnson C. Determinación de estructuras orgánicas, 1^a ed. Madrid, Reverté S.A.; 1981.
- [10] Wiener Laboratorios S.A. I.C. Rosario – Argentina; 2000.