SCREEN FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE "*in vitro*" DEL EXTRACTO TOTAL EN ETANOL Y FRACCIONES DE LA CORTEZA SECA DE *Brownea ariza* Bentham (CAESALPINIACEAE)

EMILIO JOSE ARRIETA GARCIA
JUAN CARLOS VILLALBA UPARELA

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUIMICA (GIFUS)
SINCELEJO
2005

SCREEN FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE "*in vitro*" DEL EXTRACTO TOTAL EN ETANOL Y FRACCIONES DE LA CORTEZA SECA DE *Brownea ariza* Bentham (CAESALPINIACEAE)

Trabajo de grado como requisito parcial para optar el título de Biólogo con énfasis en Biotecnología

EMILIO JOSE ARRIETA GARCIA
JUAN CARLOS VILLALBA UPARELA

Director:
RITA LUZ MARQUEZ VIZCAINO
Magíster en Biología

Codirector:
CATALINO DE LA ROSA TORRES
Magíster en Química

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN FITOQUIMICA (GIFUS)
SINCELEJO
2005

“ Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas en el presente trabajo” .

(Artículo 12º, Resolución 02 del 2003)

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ADP	Adenosin difosfato
Al	Alcaloides
α	Alfa, nivel de significación
AcOEt	Acetato de Etilo
ATP	Adenosin Trifosfato
β	Beta
Cm	Centímetro
ºC	Grado Centígrado
CF	Compuestos Fenólicos
C (-)	Control negativo
C(+)	Control positivo
$CHCl_3$	Cloroformo
Ca	Calcio
$CaCl_2$	Cloruro de Calcio
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
[ ]	Concentración
Es	Esteroides
Ep	Eter de Petróleo
EP	Estadístico de Prueba
E1, E2 y E3	Extracto 1, 2 y 3
EtOH	Etanol
Fa	Factor activado
FI,..., FXIII	Factor I,..., Factor XIII
F1, F2, F3, F4 y F5	Fracción 1, 2, 3, 4 y 5
$FeCl_3$	Tricloruro Férrico
FvW	Factor Von Willebrand
HCl	Acido Clorhídrico

H_2O	Agua
H_2SO_4	Acido Clorhídrico
h	Hora
LE	Leucoantocianinas
mg/mL	Miligramo por mililitro
MeOH	Metanol
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
µL	Microlitro
mL	Mililitro
M	Molaridad
-	Negativo
P1, P2, P3	Paciente 1, 2 y 3
+	Positivo
ppm	Partes por millón
PPP	Plasma Pobre en Plaquetas
pH	Potencial iones Hidrógeno
PC	Punto Crítico
R	Rendimiento
rpm	Revoluciones por minuto
δ	Sigma
TA	Taninos
TE	Terpenos
TLC	Thin layer chromatography
TTPA	Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada
TPA	Tromboplastina Parcial Activada
QU	Quinonas
v/v	Volumen a Volumen

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. *Brownea ariza* Bentham: a) Vista panorámica del árbol; b) Aparición de brotes de hojas tiernas; c) Inflorescencia; d) Legumbre.

FIGURA 2. Aspecto de los glóbulos rojos vistos al microscopio electrónico de barrido.

FIGURA 3. Mecanismo de la coagulación sanguínea.

FIGURA 4. Formación del coágulo de fibrina. Obsérvese la apariencia en red encerrando glóbulos rojos.

FIGURA 5. Baño serológico utilizado en pruebas de coagulación.

FIGURA 6. Rota evaporador empleado para concentrar extractos (a presión Reducida).

FIGURA 7. Ejemplo de un tipo de cromatografía en columna.

FIGURA 8. Screen Fitoquímico.

FIGURA 9. Esquema metodológico general.

FIGURA 10. CCD con sílica gel (fase estacionaria) realizadas a la **F1, F2** y **F3** con fases móviles Eter de petróleo: Acetona (V/V) en proporción 8:2, 8:2 y 6:4, respectivamente; el revelado se hizo con vainillina/H_2SO_4. Cada banda mostró un color en particular y enumeradas da abajo hacia arriba).

FIGURA 11. Reacción de formación del coágulo de fibrina (indicada con flechas) en muestras de plasma control (positivo).

FIGURA 12. Formación del coágulo de fibrina en plasma, empleando la concentración de 500 mg/mL del Et, **F4** y **F5.**

FIGURA 13. Reacción positiva (solidificación) de formación de fibrina en plasma, empleando las concentraciones de 250 y 1 mg/mL del Et, **F4** y **F5.**

FIGURA 14. Gráficas de regresión lineal indicándose la línea de tendencia central (en sentido negativo) con respecto a los valores

(representados por puntos azules) registrados por el P1, P2 y P3 usando el Et.

FIGURA 15. Gráficas de regresión lineal indicándose la línea de tendencia central (en sentido negativo) con respecto a los valores (representados por puntos rojos) registrados por el P1, P2 y P3 usando la **F4**.

FIGURA 16. Gráficas de regresión lineal indicándose la línea de tendencia central (en sentido positivo) con respecto a los valores (representados por puntos verdes) registrados por el P1, P2 y P3 usando la **F5**.

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Factores de la coagulación: peso molecular en Kd y concentración por mL de plasma ([C]/ mL).

TABLA 2. Metabolitos secundarios identificados (preliminarmente) en la corteza seca de *Brownea ariza* Bentham mediante Screen Fitoquímico.

TABLA 3. Pruebas preliminares para identificación de AL en hojas frescas de *Brownea ariza* Bentham en solución de HCl al 2%, tomando muestras a diferentes tiempos.

TABLA 4. Cantidad en gramos y Rendimiento calculado por cada extracto empleado en el screen fitoquímico.

TABLA 5. Características de los extractos obtenidos a partir del extracto total en etanol (Et).

TABLA 6. Recorridos de la muestra (Rf) en Cm anotados por cada banda (enumeradas de abajo hacia arriba) de la **F1, F2** y **F3.**

TABLA 7. Resultados de la primera experiencia de la técnica TTPA reemplazando el $CaCl_2$ por la concentración de 500 mg/mL de los extractos, registrándose valores solamente en tres de ellos.

TABLA 8. Resultados de la segunda experiencia de la técnica TTPA reemplazando el $CaCl_2$, indicándose los tiempos (promedios) de cada paciente usando las concentraciones (mg/mL) del Extracto total en etanol, **F4** y **F5**.

TABLA 9. Correlación registrada en cada paciente usando un determinado extracto.

TABLA 10. Valores de α usados para la estadística de prueba ***t***.

TABLA 11. Puntos críticos o valores de tabla usados en la estadística de prueba ***t***.

TABLA 12. Error estándar estimado (Se) calculado a partir de los datos registrados en cada paciente.

TABLA 13 Valores calculados a partir del análisis de la varianza (ANOVA) realizado a los pacientes 1,2 y 3 tratados con el **Et, F4** y **F5.**

RESUMEN

Brownea ariza Bentham (Caesalpiniaceae) es conocida popularmente por sus propiedades hemostáticas. Debido a la escasa información científica de la que se dispone en la actualidad, se realizó una investigación experimental para determinar mediante screen fitoquímico los metabolitos secundarios presentes y evaluar la posible actividad coagulante "*in vitro*" del Extracto Total en Etanol, Extracto acuoso y Fracciones en muestras de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) obtenido de tres pacientes sanos. El screen dio positivo la presencia de Leucoantocianinas, Compuestos Fenólicos, Taninos, Terpenos y Quinonas en la corteza seca y de Alcaloides en hojas frescas. Mediante maceración se obtuvo el extracto total en etanol (**Et**) y de éste cinco fracciones (**F1, F2, F3, F4** y **F5**) por medio de Cromatografía en Columna Flash empleando solventes en orden de polaridad creciente y por reflujo, el Extracto Acuoso (Ea). En un primer ensayo, se prepararon concentraciones de 500 mg, las cuales se usaron para evaluar la actividad coagulante en PPP con la técnica Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA), reemplazando el reactivo de Tromboplastina y el Cloruro de Calcio ($CaCl_2$) por el Et, Ea y Fracciones. Se registraron reacciones positivas con el **Et** y las fracciones 4 y 5 (**F4 y F5**) al reemplazar el $CaCl_2$. Se prepararon, posteriormente, concentraciones de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL del **Et, F4** y **F5**, cuyos resultados se sometieron a un análisis de correlación y regresión lineal y un análisis de la varianza (ANOVA), encontrándose que con el **Et** y **F4** el comportamiento fue inversamente proporcional a la concentración, es decir, a mayor concentración menor tiempo en darse a reacción de coagulación y con **F5** la situación fue opuesta, ya que a mayor concentración mayor tiempo en darse dicha reacción; el ANOVA

demostró no haber diferencias significativas entre las medias de los tres pacientes ensayados.

ABSTRACT

Brownea ariza Bentham (Caesalpiniaceae) is commonly known by their hemostatic properties. Since the meager data available at the present time, it was accomplished an experimental investigation to determine through phytochemical screening the present secondary metabolites and to evaluate their possible clotting activity "*in vitro*" on samples of Platelets Poor-Plasm obtained from 3 healthy patiens. The screening was positive for the presence of Leucoantocianines, Fenolics Compounds, Tanines, Terpenes and Quinones in the bark and for Alkaloids in fresh leaves. It was obtained through maceration the Total Extract on Ethanol (**Et)** and from this five fractions (**F1, F2,F3,F4 y F5**) by means of flash column chromatography, using growing polarity-solvents and by reflux, the aqueous extract. In a first assay, were prepared concentrations of 500 mg/mL, which were used to evaluate the clotting activity on PPP with the technique Activated Partial Tromboplastine Time (APTT) replacing the Tromboplastine reagent and the Calcium Chloride ($CaCl_2$). It were registered positive reactions with the Total Extract on Ethanol (**Et**) and the fractions 4 and 5 (**F4** and **F5**). After, were prepared concentrations of 500, 250, 50, 10 and 1 mg/mL of Et, F4 and F5, whose results were subjected to a correlation & lineal regression analysis and an analysis of variance (ANOVA), finding that the behavior with **Et** and **F4** was inversely proportional to concentration, in other words, with higher concentration minor time to occur the reaction of coagulation and with **F5** the situation was opposite, since a higher concentration implies a higher time to occur the reaction; the analysis of variance demonstrated there weren't significant differences among the stocking from the 3 tested patients.

INTRODUCCIÓN

A ciencia cierta no se ha establecido la fecha exacta en que se dio inicio al estudio de los componentes químicos de las plantas; simplemente se toma como referencia el momento en que el hombre las utilizó como recurso para tratar diversas enfermedades.

Según Kosel (1980): "***El motivo es que hoy toda la humanidad está enferma y con ansia espera la curación. Por consiguiente no cabe la menor duda de que la salud de casi todos los hombres está hoy ligada con cadenas, cubierta con piedras pesadas, o en muchos casos llegó ya al resbaladizo borde de la tumba; tales personas aguardan solamente el infeliz momento de su caída al sepulcro"***

Las enfermedades hoy día pueden ser tratadas de muchas maneras, pero es en los pueblos y lugares apartados de las grandes urbes en donde se suelen hacer prácticas "curativas" con los recursos naturales que ofrece la flora de dicha región. Es común encontrar que los "curanderos" o "chamanes" receten Muérdago para las úlceras, Ojo de Buey para las alergias, Cocuelo y Arizal para las hemorragias, sin mencionar un número considerable de plantas medicinales de amplia utilización (Encuesta etnobotánica – **ANEXO 1**).

El ser humano, por su afán de hacer de la tierra un lugar propicio, invierte gran parte de su potencial en solucionar el problema de mayor relevancia: Las enfermedades. Para ello, ha prestado gran atención a los compuestos o sustancias que aisladas de las plantas pueden servir para elaborar medicamentos; pero, para poder obtener los principios activos es necesario realizar ensayos preliminares que permitan determinar si tales compuestos no presentan efectos adversos.

Es así como surge la Fitoquímica, propuesta por Scheele (Rosenthaler, 1930) como aquella rama de la Química encargada de estudiar los compuestos o metabolitos secundarios de las plantas, desde su aislamiento hasta sus aplicaciones médicas. Por ello con la presente investigación se ha querido continuar aportando al campo de los Productos Naturales mediante el estudio realizado sobre la planta *Brcwnea ariza* Bentham, comúnmente conocida como Arizá, Arizal o Árbol de la Cruz , especie que pertenece a la familia Caesalpiniaceae, la cual crece en forma silvestre en diversas regiones de Colombia, incluyendo el departamento de Sucre.

El Arizá es popular por sus propiedades antihemorrágicas empleando cualquier parte de la planta en forma de decocciones, infusiones o emplastes; sin embargo, la escasa información científica acerca de las propiedades medicinales de *B. ariza* Bentham hacen de ella una planta interesante desde el punto de vista farmacológico, siendo éste el primer estudio biológico, convirtiéndose así en un valioso aporte para aquellas poblaciones que con frecuencia hacen uso del Arizá.

Esta investigación fortalece aún más la labor que el Grupo de Investigación Fitoquímica de la Universidad de Sucre (GIFUS) desarrolla dentro y fuera del claustro educativo, cuyo fin último es la proyección social en comunidades en las que de forma empírica se ensaya con extractos vegetales, como es el caso de la mayoría de poblaciones de la Costa Caribe Colombiana, las cuales no tienen el conocimiento científico acerca de las sustancias de las que hacen uso y las que muchas veces pueden tener efectos tóxicos para el organismo.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 Orden Leguminales. Las leguminosas, anteriormente, incluían las sub-familias Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, subdivisión que fue hecha teniendo en cuenta las diferencias morfológicas que presentaban en su estructura floral los diversos géneros; sin embargo, hoy día se ha optado por establecer dichos grupos como familias individuales del orden Leguminales: Caesalpiniaceae, Mimosaceae y Fabaceae (en reemplazo de Papilionaceae). No obstante, debido al uso y a la costumbre de emplear el término leguminosa, se continúa hablando de leguminosas de grano y leguminosas horticales en el medio vernacular (www.puc.cl.sw_educ/hort0498/HTML/P021.html).

Las especies incluidas en el orden de las Leguminales oscilan entre 16400 especies, caracterizadas por ser hierbas anuales y perennes; asimismo, plantas leñosas, árboles y arbustos, con nódulos producidos por bacterias gram-negativas que ayudan en la fijación del Nitrógeno en sus raíces, destacando los géneros bacterianos *Rhizobium, Brachyrhizirecimiento* y *Azorhizobium* y actinomicetos gram-positivos, efectuando simbiosis con algunas especies de la familia Mimosaceae, Caesalpiniaceae y Fabaceae (www.wisard.org/wisard/shared/asp/projectsummary.asp?kennummer=3990 ; www.chlorischile.cl/leguminosas/jmres.htm). Sus hojas son alternas, compuestas, raro simples, pinnadas o digitadas. Las flores son pentámeras, bisexuales o rara vez unisexuales, con cáliz gamosépalo, corola de 5 pétalos, tubulosa o papilionada y el androceo tiene comúnmente 10 estambres, unidos por sus filamentos o libres; el gineceo es unicarpelar, con el estilo alargado, recto o curvo. Dichas flores suelen agruparse en racimos, panículas o glomérulos. El fruto, por su parte, es uni o multiseminado y se denomina como legumbre (Strasburger, 1974; www.chlorischile.cl/leguminosas/jmres.htm).

Las Mimosaceae, son plantas leñosas y herbáceas tropicales y subtropicales, cuyas hojas son bipinnaticompuestas y paripinnadas. Sus flores son de pequeño tamaño, agrupadas en glomérulos o inflorescencias espiciformes; también, son tetrámeras y llaman la atención por la gran longitud de los filamentos coloreados de los estambres, que suelen ser numerosos. Se incluyen en esta familia la sensitiva (*Mimosa pudica*) que además es utilizada por indígenas del Vichada para tratar hemorragias en mujeres parturientas (Uribe, 1997), especies del género *Acacia* y *Entada,* características por sus legumbres grandes (Strasburger, 1974).

Las Fabaceae, se caracterizan porque sus hojas son imparipinnadas de tipo primitivo, derivándose las palmitocompuestas (*Lupinos*), las trifolioladas (*Trifolium)* y las simples (correspondientes al foliolo terminal). En lugar del foliolo terminal y del último par de foliolos se presentan zarcillos en variados géneros (*Vicia, Pisum*). Algo importante es que las estipulas pueden también desempeñar el papel de órganos asimiladores de CO_2 (*Latirás aphaca*), así como también los tallos y ramas de arbustos mimbreños o espinosos (*Sarothammus scoparius*), diversas aulagas (*Genista*) y tojos (*Ulex*) (Mabberley, 1987). Sus flores están dispuestas, generalmente, en inflorescencias racemosas dorsiventrales (Strasburger, 1974; www.puc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/P021.html).

En las Caesalpiniaceae, su flor es gradualmente papilionacea dorsiventral, cuya prefloración de la corola es ascendente. Estas plantas, son leñosas subtropicales, con hojas simples o doblemente paripinnadas, siendo muy conocidas las especies mediterráneas *Ceratonia siliqua* (algarrobo) y *Cercis siliquastrum* (árbol del amor). También, la acacia de tres espinas (*Gleditsia triacanthos*), oriunda de Norteamérica, con espinas caulinares ramificadas y especies tropicales de *Cassia*, empleadas en medicina popular (Strasburger,

1974). *Erithrina fusca* es conocida como planta fijadora de N, al igual que *E. poeppigiana* (www.unex.es/botanica/LHB/rosidae/caesalpiniaceae.htm; www.arbolesornamentales.com/Caesalpiniaceae.htm).

En investigaciones realizadas con el fin de evaluar la actividad antihemorrágica de plantas de la familia Caesalpiniaceae tales como *Brownea rosademonte, Brownea orellana, Senna dariensis* y de *Pleopeltis percusa* (Polypodiaceae) contra el efecto hemorrágico del veneno de *Bothrops atrox* y otras especies de serpientes venenosas, se logró neutralización del 100%, situación que puede ser explicada por la presencia de constituyentes químicos de las plantas con esta propiedad; de las sustancias responsables de la misma actividad en otras especies de vegetales se encuentran el compuesto wedelolactone (extraído de *Eclipta prostrata*), taninos (*Diospyros kaki*) y extractos de raíces (compuesto HI-RVIF) de *Hemidesmus indicus, Pluchea indica*, etc. (Alam *et al*, 1994; Alam y Gómez, 1995). La capacidad neutralizadora de los extractos es debida a la inhibición de la enzima Fosfolipasa A_2 del veneno de serpientes (Otero *et al*, 2000) y a la presencia de sustancias queladoras de metales en *Brownea orellana* (Duke, 1998).

La importancia económica de estas familias radica en la capacidad de crecer en terrenos con condiciones extremas de nutrientes, como lo son aquellos terrenos pobres en Nitrógeno, calcáreos y arenosos típicos de las estepas y de tierras semidesérticas. Esta capacidad les permite acumular el N indispensable para crecer y desarrollarse, utilizándose, igualmente, como abonos verdes debidamente soterrados. Las especies con esta propiedad son los tréboles (*Trifolium pratense*), la alfalfa (*Medicago sativa*) y la esparceta (*Onobrychis viciaefolia*). Otras dan semillas alimenticias de mucha importancia, ricas en albuminoides y en fécula, entre ellas las habas (*Vicia faba*), los guisantes (*Pisum sativum*), los garbanzos (*Cicer arietinum*), las

lentejas (*Lens esculenta*) y las judías oriundas de Suramérica (*phaseolus vulgaris*). Asimismo, se encuentran plantas oleaginosas como la soja (*glycine soja*) y el cacado. De las plantas leñosas merece citarse la falsa acacia (*Robinia pseúdacacia*) en Norteamérica, útil para la repoblación forestal de los países secos y además, plantas ornamentales como *Laburnum anagyroides* (Europa meridional) y la glicina (Asia oriental). En medicina se emplean *Ononis spinosa* y *Glycyrrhiza glabra*, difundida desde la región mediterránea hasta el Asia central. Igualmente, la madera de los árboles es de excelente calidad, utilizándose, además, en la producción de gomas, tintes y resinas (Strasburger, 1974).

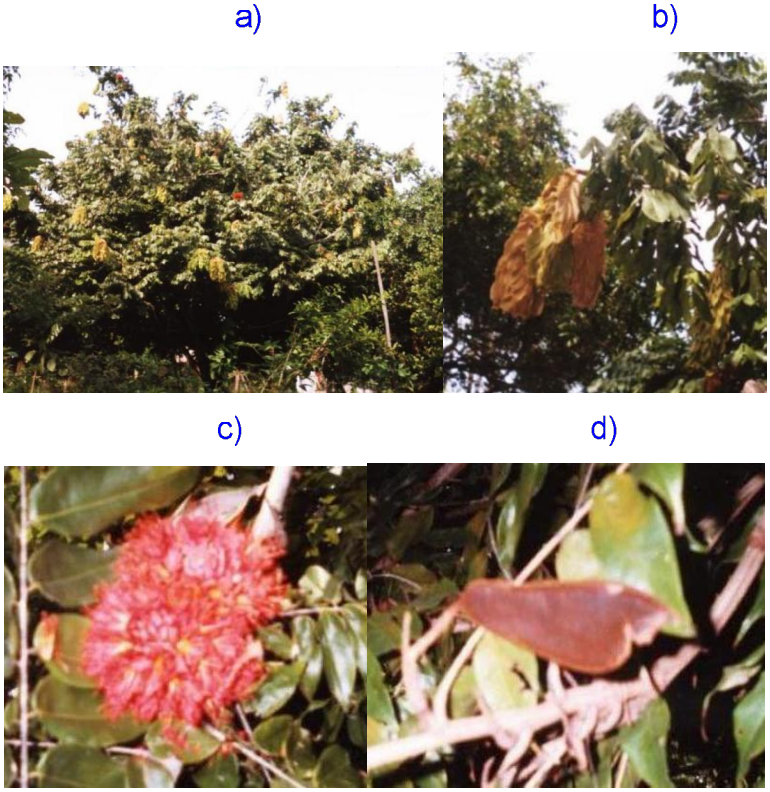
2.1.1 *Brownea ariza* Bentham. La especie de interés en este estudio es *Brownea ariza* Bentham, la cual pertenece a la familia Caesalpiniaceae y se conoce popularmente con diversos nombres dependiendo del lugar de ubicación, así: "Palo de Cruz", "Palo de Rosa" en Llanos Orientales; "flor de la Cruz", "Rosa de la Cruz" en Huila; y "Arizá", "Arizal" en Bolívar, Córdoba y Sucre. En Perú, presenta nombres vulgares tales como "Monterillo" y "Palo de Cruz" (García Barriga, 1992; Gupta, 1995). Asimismo, *B. ariza* Bentham presenta los siguientes sinónimos: *Brownea princeps* Linden ex Otto y *Hermesias ariza* (Bentham) Kuntze (Gupta, 1995). Dicha especie ha sido registrada en Colombia en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Chocó, Magdalena, Meta, Putumayo (García Barriga, 1992), Arauca, Caquetá, Cauca, Casanare, Huila, Tolima y Valle, en alturas comprendidas entre los 100 y 1.700 metros sobre el nivel del mar (Gupta, 1995).

2.1.2 Clasificación taxonómica.

REINO: Vegetal
FILUM: Magnoliophyta o Angiospermae
CLASE: Magnoliopsida o Dicotiledoneae
ORDEN: Leguminales
FAMILIA: Caesalpiniaceae
GENERO: *Brownea*
ESPECIE: *Brownea ariza*

2.1.3 Descripción botánica. *Brownea ariza* Bentham es un árbol de 3 a 25 metros de alto, de copa redondeadas, hojas alternas paripinnadas, 6-12 pares de foliolos opuestos, subcoriáceos; los inferiores aovados o aovado-elípticos, acorazonados en la base y acuminados en el ápice, más o menos marginados, de 8- 16 cm. de largo por 2-5 cm. de ancho. Las hojas tiernas cuelgan desmadejadas; inflorescencias en racimos semiesféricos, grandes (10-20 cm. de diámetro), axilares o terminales, brácteas rojas, blanco-tomentosas en el envés, de unos 4 cm. de largo, flores de color escarlata: 4 sépalos, 5 pétalos de 3-4 cm. de largo y 1.5 cm. de ancho, 11 estambres; legumbre comprimida de 15-18 cm. de largo (**FIGURA 1)**. Este árbol presenta cierta característica notoria que se manifiesta al hacer cortes transversales en el leño, apareciendo una cruz en el floema debido, posiblemente, a los haces fibroleñosos que lo componen (García Barriga, 1992; Gupta, 1995).

FIGURA 1. *Brownea ariza* Bentham: a) Vista panorámica del árbol; b) Aparición de brotes de hojas tiernas; c) Inflorescencia; d) Legumbre.



2.1.4 Usos etnomédicos. Desde el descubrimiento del Arizá o palo de Cruz en Colombia por el padre Franciscano Fray Diego García, ha sido utilizado, tradicionalmente, para controlar cualquier tipo de hemorragias; de allí que la Real Expedición de Mutis diera gran importancia a sus propiedades (Muñoz, 1994; Gupta, 1995).

García Barriga (1992), por su parte, expone que en medicina popular son ampliamente utilizadas las hojas, las flores, el tallo y las virutas de la madera y corteza en casos de hemorragias internas y heridas sangrantes; se puede tomar como ejemplo el uso que daban los Misioneros Capuchinos a las inflorescencias de Arizá con las que se preparaban decocciones que eran

efectivas para "curar" las hemorragias internas que se presentaban después del parto; además, las flores en infusión eran también empleadas como laxantes (Pérez-Arbeláez , 1978; Muñoz, 1994).

2.1.5 Química, Farmacología y actividad biológica. Los estudios etnobotánicos indican que *Brownea ariza* Bentham es una planta ampliamente utilizada en Colombia con fines hemostáticos; sin embargo, no se han realizado investigaciones experimentales de esta importante especie medicinal (Gupta, 1995), salvo por el presente trabajo.

2.2 HEMOSTASIA

2.2.1 Definición. Casas *et al.* (1994) define como el conjunto de mecanismos que controlan la pérdida de sangre a partir de la rotura de un vaso. Mariscal-Ibarra (1995), expone que la hemostasia es el proceso mediante el cual, después de un daño al vaso sanguíneo, la hemorragia se limita y la sangre permanece fluida en el torrente sanguíneo, enfatizando que hemostasia y coagulación no son sinónimos, ya que la coagulación solo representa una fase de aquella. Forero y Forero (1998), por su parte, describe como el perfecto equilibrio dinámico entre un conjunto de mecanismos y procesos bioquímicos para mantener la fluidez de la sangre y la integridad vascular. En ILADIBA (2001), se anuncia la hemostasia como una secuencia de procesos en donde interactúan elementos humorales y celulares en fenómenos de sincronía espacio-temporal para control de un sangrado producido tras una lesión vascular.

Como quiera que se expongan estos y muchos otros conceptos acerca de la hemostasia se percibe que no es más que un proceso que ocurre normalmente en nuestro organismo, proceso que controla y vigila la pérdida

desmedida de sangre o la coagulación exagerada como lo es la coagulación intravascular diseminada (Uribe, 1995).

2.2.2 La Sangre (FIGURA 2).

FIGURA 2. Aspecto de los glóbulos rojos vistos al microscopio electrónico de barrido (www.harunyahya.com/es/naturaleza07.phb).

2.2.2.1 Aspectos Generales. La sangre es la "autopista" bioquímica que conecta todas las células del cuerpo y es el medio por el cual se transportan el oxígeno y los nutrientes; además, recoge los materiales de deshecho producidos por las diversas reacciones metabólicas. Asimismo, la sangre transporta otras sustancias importantes como hormonas, enzimas y anticuerpos (Ab), y tiene entre sus constituyentes básicos las células que defienden el cuerpo contra los invasores extraños (Barnes y Curtis, 1995).

Pese a la gran importancia que recibió la sangre en tiempos de Hipócrates (460-377 a.C.), fue hasta bien avanzada la época moderna en que se comenzó a dilucidar sus funciones, ejemplo de ello la circulación sanguínea propuesta por William Harvey en 1628, el concepto de enzima propuesto por el Fisiólogo Wilhelm Kühne en 1867 y la determinación por parte de Giuliu Bizzozero en 1882 del papel que cumplen las plaquetas en la Coagulación Sanguínea (ILADIBA, 2001).

En una persona normal sana, el 45% de su volumen son glóbulos rojos (en su mayoría), glóbulos blancos y plaquetas; el resto está constituido por un líquido claro y amarillento llamado plasma, el cual es agua en un 95%, conteniendo a su vez, nutrientes como glucosa, grasas, proteínas, vitaminas, minerales y los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas. Se considera que el nivel de sal en el plasma es proporcional al nivel de sal en el agua de mar (Encarta, 2002).

2.2.2.2 Las Plaquetas. Las plaquetas son las células que reaccionan primero ante una lesión endotelial. Son anucleadas, miden en promedio de 2 a 5 μm de diámetro, y poseen una vida media entre 7 y 10 días, además, su producción está controlada por la trombopoyetina renal o extrarrenal y otros reguladores. Las plaquetas se originan en la médula ósea por fragmentación del Megacariocito y se encuentran en sangre periférica a una concentración entre 150.000 y 450.000 plaquetas por mililitro (mL) (Uribe, 1995; Forero y Forero, 1998; ILADIBA, 2001).

Los componentes plaquetarios mas importantes son la membrana, el sistema tubular conectado con la superficie, los microtúbulos marginales y el sistema tubular denso, los cuerpos de inclusión, y también, las mitocondrias, gránulos de glucógeno, microsomas y los restos del aparato de Golgi (Uribe, 1995).

Dentro de las principales funciones de la plaqueta se pueden mencionar la formación del trombo hemostático, para lo cual utiliza sus características de adhesividad, agregación y liberación. La adhesividad es la capacidad de las plaquetas de adherirse a otras superficies, como colágeno y membrana basal de los endotelios vasculares expuestos; la agregación, por otra parte, es su capacidad para unirse a otras plaquetas, donde ocurre la relajación de su forma contráctil, emisión de dendritas, fusión plaquetaria y metamorfosis

viscosa; por último se tiene la reacción de liberación energética, donde se liberan compuestos plaquetarios internos en dos fases: la primera, inducida por trombina y colágeno, liberando el contenido de los gránulos densos (que contienen ATP, serotonina, ADP, calcio y magnesio), y la segunda, donde se libera el contenido de los gránulos alfa (que contienen Factor 4 plaquetario, tromboglobulina, fibrinógeno, fibronectina y Factor VIII von Willebrand [F VIIIvW] (Forero y Forero, 1998).

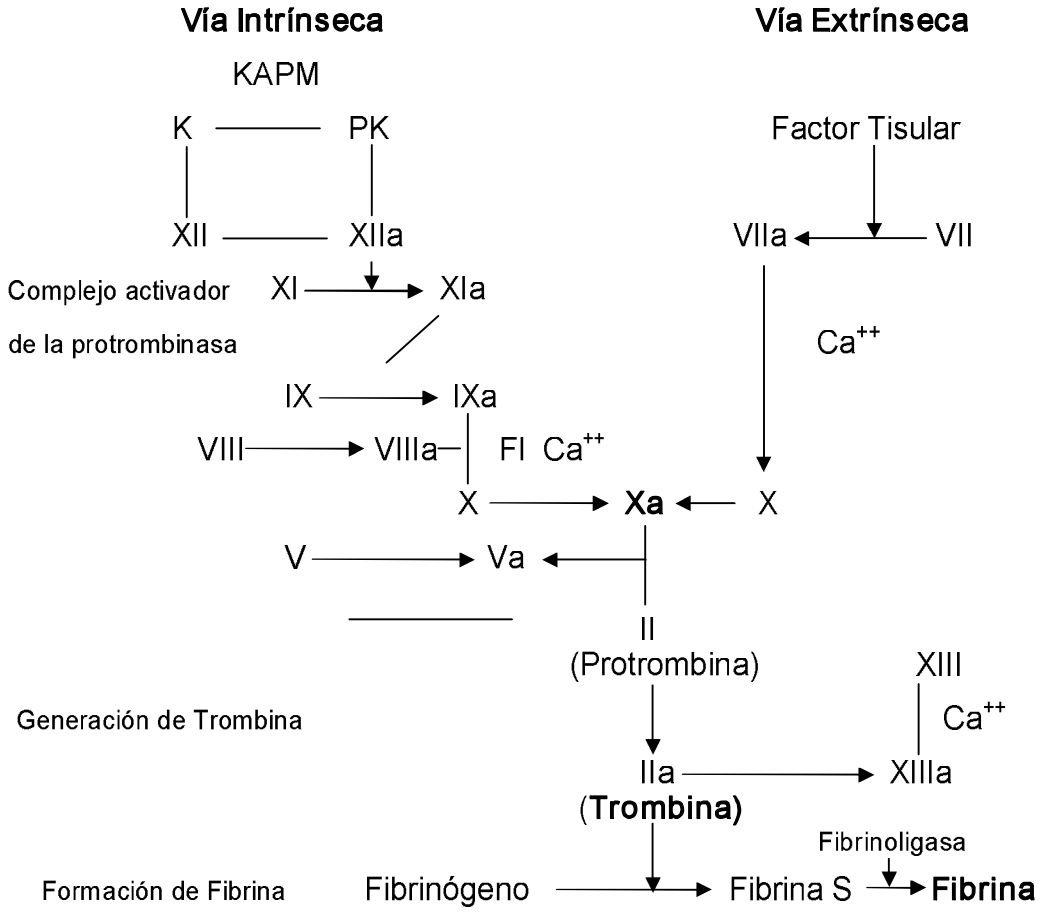
2.2.2.3 Coagulación Sanguínea (FIGURA 3). Ante la lesión de un vaso sanguíneo, la evolución ha resuelto la pérdida de sangre por medio de un taponamiento que obstaculice el sangrado (ILADIBA, 2001).Dicho taponamiento, conocido científicamente como Trombo, se forma al momento de lograr la "captura" de una cantidad considerable de elementos sanguíneos sobre una lesión, gracias a una molécula libre en la sangre que consigue una formación en malla, cuando las circunstancias lo ameriten. La mencionada molécula es denominada Fibrinógeno, el cual, por reacciones de activación, es convertido en Fibrina, la que a su vez es la partícula elemental de la malla (Casas *et al*, 1994; Uribe, 1995; Forero y Forero, 1998; ILADIBA, 2001). Estudios en los que se ha explorado el papel del fibrinógeno en los procesos de sangrado, sugieren la importancia de esta proteína plasmática en la organización celular (Suh *et al*, 1995).

El Fibrinógeno se transforma en la malla de fibrina, por señales de activación generadas en el sitio lesionado, proceso comandado por la exposición de un factor que normalmente yace oculto en el endotelio: el Factor Tisular. Este factor junto al factor VII (F-VII) transforma al factor IX (F-IX) y al factor X (F-X) en formas activas IXa y Xa, ello involucra reacciones sucesivas con las que se permita la activación de los factores de la coagulación, los cuales tienen el compromiso de informar a los controladores celulares (plaquetas) y

humorales (trombina) dar inicio a una respuesta hemostática (Forero y Forero, 1998; ILADIBA, 2001).

La formación del trombo, a nivel molecular, es promovido por la expresión de receptores en la superficie plaquetaria activados por proteasas PAR (del inglés Protease-Activated Receptor), familia que incluye a 4 receptores acoplados a glicoproteínas: (PAR)-1,-2, -3, -4, de los que solamente PAR-1, -3 y -4 desempeñan funciones trombínicas. PAR-2, por su parte, es el único que no es activado por trombina, pero si por los factores VIIa y Xa, de forma directa e indirecta, respectivamente (Riewald and Ruf, 2001; ILADIBA, 2001).

FIGURA 3. Mecanismo de la coagulación sanguínea (Forero y Forero, 1998).



Los factores VIIa y Xa pueden facilitar eventos de señalización celular proinflamatorios mediados por PAR, según lo expuesto por Riewald y Ruf (2001), quienes demostraron que a concentraciones relativamente bajas de Factor Xa se da activación de señalización celular típica de la fase temprana de la coagulación y que, además, presenta una afinidad significativa por Factor (FT) y Factor VIIa, formando así un complejo de alto orden basado en el complejo ternario TF-VIIa-Xa, el cual durante la iniciación de la coagulación, sobre la superficie celular, tiene suficiente vida media para activar a PAR-1 y -2, sin requerir la activación masiva de proteasas que podría conducir a una coagulación intravascular diseminada (CID); a su vez, las interacciones específicas de TF-VIIa, posiciona el sitio activo Xa en una orientación más favorable para la activación de los PAR, hecho que puede explicar la activación eficiente de PAR-2 por el complejo binario TF-VIIa; asimismo, cuando el TF da inicio a señalización celular de la coagulación, inseparablemente da pie a una activación de las vías del proceso inflamatorio.

De Jonge *et al* (2003) expone que la activación, tanto de la coagulación como de la inflamación está fuertemente ligada, hecho demostrado al trabajar con sujetos humanos saludables a los que se les administró, por vía intravenosa, factor recombinante VIIa (rVIIa), en cuyos plasmas se presentó un incremento considerable de interleucina-6 y -8 (IL-6 e IL-8), siendo este el primer estudio en comprobar que la activación de la coagulación podría inducir la liberación de citocinas; además el rVIIa desembocó en generación de trombina, estimulando la expresión de IL-6 y -8, TNF y proteína quimiotáctica b1 por parte de monocitos y células endoteliales, probablemente debido a su actividad catalítica y al clivaje de receptores de superficie celular activados por proteasa. El F-VIIa conlleva a cambios proinflamatorios en células mononucleares por la activación de PAR-2 y

PAR-1, sin descartar la posibilidad de que niveles fisiológicamente altos de F-VIIa pueden ser responsables de la respuesta inflamatoria, y el F-Xa a concentraciones altas activa la señalización en células que expresan TF y PAR-2. Igualmente, al inhibir la activación de la coagulación por administración del inhibidor de TF, la no generación de trombina no afectó las respuestas de las citocinas pero si la administración del complejo TF-VIIa, rNAPc 2 (proteína c2 anticoagulante de nematodo).

Los factores de coagulación son proteínas plasmáticas que son sintetizados en su mayoría en el hepatocito, presentan actividad proteasa y circulan en forma inactiva (zimógenos) hasta que son activados por diferentes mecanismos, produciéndose una serie de reacciones entre ellos. Los factores son los siguientes (**TABLA 1**).

TABLA 1. Factores de la coagulación: peso molecular en Kd y concentración por mL de plasma ([C]/ mL).

FACTORES		PM (Kd)	[C]/mL
Fibrinógeno	I	340	2-4 μg
Protrombina	II	72	200 μg
Trombina tisular	III	45	-
Iones calcio	IV	-	-
Proacelerina	V	300	59 μg
Proconvertina	VII	48	1-2 μg
F. antihemofílico A	VIII	89-200	0.2 μg
F. von Willebrand	F v W	1200-1500	7 μg
F. antihemofílico B	IX	55	3-4 μg
F. Stuart Power	X	55	6-8 μg
Antecedente tromboplastico del plasma	XI	160	4-7 μg
F. Hageman	XII	90	10 μg
F. estabilizante de la fibrina	XIII	320	10-20 μg
F. Fitzgeral	HMWK-110	70-80	-
F. Fletcher	XIV	88	20-50 μg

Conforme al avance en los aislamientos de factores implicados en procesos de coagulación se tiene el descubrimiento de la vitamina K, compuesto antihemorrágico descubierto en 1929 en algunas plantas (Lechuga, Tomate, Espinaca, Repollo), la cual es un derivado del fitol, incluida en el grupo de las naftoquinonas (De Marcano y Hasegawa, 1991; Valencia, 1995). El papel que desempeña la vitamina K (VK) en el proceso de la coagulación se evidencia en aquellos factores VK-dependientes [factores II (protrombina), VII, IX y X], quien funciona como cofactor para la enzima endoplásmica r-glutamilcarboxilasa (r-gc), importante para aquellas proteínas que forman grupos de unión al calcio; de igual forma, deficiencias de VK son debidas por consumo de cumarinas y por mal funcionamiento de su precursor a causa de mutaciones, inclusive en el gen r-gc, lo que conlleva a deficiencia de todos los factores pro-coagulantes y anticoagulantes VK-dependientes, hecho demostrado por Spronk, *et al* (2000). Además, en casos de enfermedad coronaria del corazón, según reporte de Ning Xu, *et al* (1998), las proteínas dependientes de VK se encuentran elevadas y asociadas, probablemente, con lipoproteínas ricas en triglicéridos (TGRLP) *in vivo*, aumento que podría conducir a un estado de hipercoagulación y de hipertrigliceridemia, éste último aún en estudio. Asimismo, los factores II, VII, IX y X sufren modificaciones conformacionales para unirse al calcio, sin descartar las interacciones electrostáticas entre ellos. Crowther, *et al* (2002) demostró que la administración de VK por vía oral era más efectiva al momento de lograr reducción del INR (Relación Internacional Normalizada) o control en la terapia con anticoagulantes orales, en pacientes recibiendo warfarina. Sugieren que para reducir el riesgo de hemorragia, el uso de 1 mg de VK oral en pacientes asintomáticos que reciben warfarina y cuyos INR oscilen entre 4.5 y 10, sin descartar la posibilidad de próximos estudios relacionados con el efecto clínico de dosis bajas de VK.

Esencialmente, la activación del mecanismo de coagulación se produce en tres etapas (**FIGURA 3**):

a) Generación de protrombinasa
b) Generación de trombina
c) Formación de fibrina (Forero y Forero, 1998)

2.2.2.3.1 Generación De Protrombinasa. La protrombinasa es el complejo activador de la protrombina, la cual se forma gracias a activaciones sucesivas de varios factores de coagulación, ya sea por la vía intrínseca o por la vía extrínseca de la coagulación (Gauntlett y Myers, 1993; Casas *et al*, 1994; Forero y Forero, 1998).

La vía intrínseca se inicia cuando la sangre entra en contacto con superficies de carga negativa, como podrían serlo el colágeno, plaquetas, etc., fenómeno denominado "factor de contacto", al cual se une el factor XII y enzimas tales como la calicreína y plasmina. La vía extrínseca, por otra parte, se inicia cuando la sangre entra en contacto con sustancias titulares (Factor Tisular) presentes en la mayoría de los tejidos, en especial en membranas celulares (Forero y Forero, 1998).

2.2.2.3.2 Generación De Trombina. El complejo activador de la protrombina o protrombinasa actúa sobre el factor II para activarlo y convertirlo en factor II activado (FIIa) o Trombina (Casas *et al*, 1994; Forero y Forero, 1998). La formación de ésta como proteasa es transformar Fibrinógeno en Fibrina (ILADIBA, 2001).

2.2.2.3.3 Formación De Fibrina. El Fibrinógeno está conformado por tres cadenas polipeptídicas (alfa, beta y gamma). Este, al sufrir proteólisis sucesivas, desprende fragmentos terminales de las cadenas alfa y beta,

conocidos como fibrinopéptidos A y B; el resto de la molécula, esto es, los monómeros de fibrina se unen por puentes de hidrógeno, formando así los polímeros de fibrina (fibrina S) que por acción del factor XIIa (fibrinoligasa) activado por trombina, adquiere mayor cohesión y estabilidad (Uribe, 1995; Forero y Forero, 1998) **(FIGURA 4).**

FIGURA 4. Formación del coágulo de fibrina. Obsérvese la apariencia en red encerrando glóbulos rojos **(**www.harunyahya.com/es/natutaleza07.phb**).**

La reacción de coagulación puede ocurrir al extraer sangre del cuerpo y colocarla en un tubo de ensayo, por el contacto con una superficie extraña (Barnes y Curtis, 1995). Asimismo, puede evitarse o prolongarse dicha reacción empleando anticoagulantes orales, heparina (altas dosis), niveles bajos de fibrinógeno, deficiencia adquirida de cualquier factor, requerimiento de antitrombina III por parte de la heparina con el fin de activar la anticoagulación, entre otros (Forero y Forero, 1998; Levy and Montes, 2000).

2.2.3 Pruebas de laboratorio. Se han diseñado una gran cantidad de pruebas para evaluar los sistemas que participan en la hemostasia. Para su buena ejecución se deben controlar con mucha exactitud y cuidado las

condiciones en que se realizan los ensayos, los reactivos, la temperatura, el tiempo, el pH, los equipos e instrumentos (Casas *et al*, 1994; Forero y Forero, 1998).

Según Casas *et al* (1994), las pruebas para el estudio de la coagulación pueden clasificarse en globales (dependen de un número alto de factores y/o evalúan un conjunto de componentes del mecanismo hemostático) o específicas (analizan en forma selectiva los factores o elementos que intervienen o forman parte del sistema o sistemas donde se encuentre alguna anormalidad en las pruebas globales). A su vez, las pruebas se clasifican según las áreas de estudio, que básicamente son:

a) Sistema plaquetario.
b) Vía intrínseca.
c) Vía extrínseca.
d) Vía común.
e) Estabilización de la fibrina.
f) Mecanismos plasminógeno-plasmina; productos de degradación del fibrinógeno-fibrina. Pruebas de paracoagulación.
g) Control del tratamiento con anticoagulantes.

2.2.3.1 Materiales y reactivos. De acuerdo a lo planteado por Casas *et al* (1994) y Forero y Forero (1998), el pH de las soluciones y reactivos usados es un factor decisivo en los estudios de coagulación, así como lo es la temperatura, ya que las pruebas se realizan al baño María a 37º C (+/- 0.5º C) (**FIGURA 5)**. Se recomienda además, el uso de pipetas automáticas debido a que se manipulan cantidades muy pequeñas y en pro de una buena reproducibilidad.

FIGURA 5. Baño serológico utilizado en pruebas de coagulación.

El empleo de cronómetros contrastados es fundamental, ya que se miden tiempos muy pequeños, del orden de segundos. Actualmente, estos análisis se realizan en equipos automáticos que controlan la temperatura, el volumen de la muestra, la medida del tiempo de reacción y los cálculos de forma automática. Se utiliza agua destilada para preparar y reconstituir los reactivos. El anticoagulante habitual para estudios de coagulación es el citrato de sodio en solución 0.109 M (32 g/L), en proporción 1:9 (Una parte de citrato por cada 9 de sangre). Aunque el cloruro de calcio aporta el calcio necesario quelado por el anticoagulante; se trata de un reactivo de "disparo" o puesta en marcha de muchas técnicas de coagulación y la solución de uso es 0.025 M (M/40), aunque en algunas pruebas se utiliza otras concentraciones.

2.2.3.2 Obtención de plasma pobre en plaquetas (PPP). Se consigue mediante una centrifugación intensa a 2.700 r.p.m. durante 10 minutos.

2.2.3.3 Medida de la formación del coagulo. Las pruebas empleadas son de "punto final" y la lectura se realiza cuando ocurre la formación de la fibrina; ésta se visualiza por el enturbiamiento y solidificación de la mezcla plasma-

ión reactivo o mediante lectores automáticos (Casa *et al*, 1994; Forero y Forero, 1998).

2.2.3.4. Pruebas de orientación global.

2.2.3.4.1 Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). Evalúa la eficiencia del sistema intrínseco de la coagulación, midiendo el tiempo de la formación del coagulo de fibrina. Dicha prueba se fundamenta en que al agregar al plasma del paciente tromboplastina parcial, que sustituye a los fosfolípidos de la membrana plaquetaria en presencia de calcio iónico, se activan los factores de la vía intrínseca para la formación del complejo activador de la `protrombina, seguida de la formación de trombina y fibrina. La activación de contacto se estabiliza por la adición de un activador (caolín, partículas de sílice micronizadas o ácido elágico) al reactivo. Los valores de referencia oscilan entre 29.5 y 36 segundos (Forero y Forero, 1998). Se suele utilizar un reactivo comercial que contiene una suspensión de cefalina y otra de un activador, o bien un sistema que contenga en un solo reactivo a ambos (Casas *et al*, 1994).

2.3. Fitoquímica o estudio de los Componentes Químicos de las Plantas.

De Marcano y Hasegawa (1991) definen la Fitoquímica como la disciplina que permite abordar el estudio de las sustancias o metabolitos secundarios de origen vegetal, valiéndose de sencillas y novedosas técnicas de aislamiento, purificación y caracterización. Bruneton (1991) define a la química de productos naturales como la responsable del estudio de las materias primas y de las sustancias con propiedades terapéuticas de origen vegetal. Valencia (1995) describe que el objetivo principal de la Fitoquímica es el estudio de los constituyentes químicos de las plantas, abarcando su

biosíntesis, metabolismo, distribución natural, función biológica, aislamiento, purificación y estructura química.

Como puede notarse, todas las definiciones anteriores apuntan hacia un mismo fin: Estudiar exhaustivamente plantas medicinales teniendo en cuenta aspectos etnobotánicos y técnicas de laboratorio de fácil y cuidadosa ejecución.

Una investigación fitoquímica bien estructurada debe permitir el aislamiento de los metabolitos secundarios responsables de diversas actividades biológicas. Pero antes es crucial obtener extractos vegetales que serán sometidos a fraccionamientos con el fin de aislar los constituyentes activos en forma pura, ayudados de procesos convencionales de separación de mezclas y sucesivas cristalizaciones, compuestos analizados mediante técnicas espectroscópicas con la finalidad de establecer sus posibles estructuras.

La extracción de las sustancias vegetales responsables de una actividad biológica determinada depende del tipo de material de la planta a usar, ya sea en forma fresca o seca. La primera de ellas se emplea en la preparación de remedios, en la industria de alimentos y cosméticos. Para el caso de plantas secas se emplea en casos en que la dosis no es crítica, es decir, cuando aún se conserva la capacidad curativa luego del secado. En lugares tropicales, el material vegetal recolectado se suele secar al aire y sol, pero si se trata de raíces y cortezas, estas pueden ser sometidas a temperaturas altas, incluso en hornos o estufas (Valencia, 1995).

Un aspecto importante a la hora de planear estudios fitoquímicos es determinar la planta con base a su ubicación, puesto que el tipo de suelo y las condiciones medioambientales influyen en la producción de un metabolito

específico; el hecho de que sean plantas de una misma especie y ubicadas en escenarios diferentes no indica que la presencia de sustancias activas sea la misma, empleándose por ello material vegetal de un mismo origen (Domínguez, 1973).

2.3.1 Biogénesis de los metabolitos secundarios. El papel que desempeñan las plantas en el ritmo de vida del planeta es crucial; ejemplo de ello es el proceso de la fotosíntesis, a partir del cual se elaboran productos carbonados que sirven de sustratos para la elaboración de otros alimentos importantes (Barnes y Curtis, 1995). De la reacción fotosintética se obtienen carbohidratos, grasa y proteínas, considerados como metabolitos primarios. A partir de los mencionados metabolitos se sintetizan los secundarios o constituyentes químicos (Valencia, 1995).

2.3.2 Screen Fitoquímico. De la Rosa (2003) establece para la determinación cualitativa de los posibles metabolitos secundarios encontrados en muestras secas vegetales una metodología consistente en pruebas de coloración y reacciones que indican la presencia de compuestos particulares. Dichas pruebas son las siguientes:

a) Ensayo de Shinoda (o de la cianidina), para flavonoides (FL) y otros compuestos con el núcleo δ-Benzopirona.
b) Ensayo de Rosenheim, para leucoantocianinas (LE).
c) Ensayo del tricloruro férrico ($FeCl_3$), para compuestos con hidroxilos fenólicos (CF).
d) Ensayo de la gelatina-sal, para taninos (TA).
e) Ensayo de Liebermann- Burchard, para triterpenoides (TE) y/o esteroides con grupos dieno conjugados reales o potenciales.
f) Ensayo de Borntranger, para nafto y antroquinonas (QU).

g) Ensayo para alcaloides (AL), empleando reactivos precipitantes como Dragendorff, Mayer, Ácido Fosfotúngstico, Wagner, Hager, Valser y reineckato de amonio.

2.3.3 Destilación a presión reducida. Muchas veces el punto de ebullición de un solvente es muy alto, lo que generaría descomposición de sustancias termolábiles. En el laboratorio de Química Orgánica se realiza destilación a presión reducida, la cual consiste en eliminar solventes de un medio de reacción con la ayuda de evaporadores rotatorios (**FIGURA 6**) en un vacío de aproximadamente 20 mmHg usando trompas de agua cuya eficiencia dependerá de la presión de esta y de su temperatura. Cuando no se disponga de agua corriente a alta presión se puede recurrir a un sistema local para aumentar la presión mediante una bomba centrífuga que permita la recirculación de agua dentro del recipiente y si esta se enfría se aumenta la eficiencia del sistema (Pomilio y Vitale, 1998).

FIGURA 6. Rota evaporador empleado para concentrar extractos (a presión reducida).

2.3.4 Cromatografía. Este término procede del griego *Chrom* = Color y *Graphe* = Escritura. Michael Semionovich Tswett (1906), botánico ruso, fue el primero en llevar a cabo separaciones cromatográficas; por su parte Kuhn y

Lederer (1930) perfeccionaron la cromatografía en columna, y en 1941 Martin y Synge ganaron el premio Nóbel gracias a la cromatografía de reparto (Cromatografía liquido-liquido) (Machado, 1996).

Pues bien, la cromatografía puede definirse como la separación de una mezcla de moléculas por distribución entre dos o más fases, una de ellas es esencialmente bidimensional (una superficie) y la fase restante, normalmente la principal, está en contacto con ella moviéndose a contracorriente (Pasto y Jonson, 1981; De La Rosa, 2003). Existen varias clases de cromatografía entre las cuales las más importantes son: La de adsorción, la de reparto, de intercambio iónico y la filtración molecular; estos tipos d4e cromatografía pueden ser utilizados a través de diversas técnicas, siendo las principales la cromatografía en papel, en capa delgada, de gases, en columna y la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE o HPLC) (Machado, 1996).

2.3.4.1 Cromatografía en capa delgada (CCD o TLC = Thin-Layer Chromatography). La TLC es una aplicación especial de la cromatografía de adsorción, en la cual se utiliza una capa fina de adsorbente soportada encima de una superficie plana; la elusión o el desarrollo del cromatograma se consigue gracias al movimiento capilar ascendente del disolvente a través de la fase estacionaria (Silica gel, alúmina, kieselguhr y celulosa) (Pasto y Jonson, 1981).

Al momento de elegir un disolvente adecuado, se preparan placas pequeñas (portaobjetos) a las que se les siembra la muestra desarrollándolas en los distintos solventes a ensayar; de esta manera se tendrá certeza de escoger el disolvente que permita una mejor separación (Pasto y Johnson, 1981; Valencia, 1995; Machado, 1996; De la Rosa, 2003).

La CCD puede emplearse para trabajos de tipo preparativo en cantidades muy pequeñas, empleando para ello capas de adsorbente de mayor grosor y aplicando la muestra en forma de una banda lineal; se desarrolla solo una estrecha sección del cromatograma con el uso de indicadores para localizar las bandas de las sustancias. Posteriormente, se separan las bandas de la placa y el producto del adsorbente (Pasto y Johnson, 1981).

En la TLC las manchas producidas pueden visualizarse por medio de luz UV o bien por medio de la luz del día o detectarse por medio de reactivos esparcidos sobre la placa. En el primer caso, la mancha puede separarse y diluirse en un disolvente adecuado, después se realizará un IR, UV o de fluorescencia. Para el caso de reactivos rociados sobre la placa, solo se tendrá conocimiento de que clase de sustancia se trata por la coloración que se obtenga después de rociar y secar la placa (Valencia, 1995).

2.3.4.2 Cromatografía en Columna (FIGURA 7). Esta operación se lleva a cabo en un aparato llamado columna, constituida por un tubo de vidrio dentro del cual se deposita, en la parte inferior, algodón u otra sustancia fibrosa; la columna se llena con cualquiera de los siguientes adsorbentes: gel de sílice, alúmina, celulosa, florisil, poliamida, variados sephadex, celulosa intercambiadora de iones y resinas de intercambio iónico. La mezcla a separar se coloca encima del adsorbente y se adiciona un disolvente adecuado, el cual desaloja o eluye los componentes de la mezcla; la velocidad con que descienden los componentes es diferente y depende de la capacidad de adsorción relativa que posean (Pasto y Jonson, 1981; Gros, Seldes y Burton, 1985). Para acelerar el procedimiento de separación se trabaja en general a mediana presión (2 a 3 atmósferas) con bombas adecuadas o bien con Nitrógeno a presión o bien a alta presión (CLAP) que requiere instrumental adecuado (Gros, Seldes y Burton, 1985).

FIGURA 7. Ejemplo de un tipo de cromatografía en columna.

3. METODOLOGÍA

Esta investigación es clasificada como experimental debido a que se intenta dar explicación a un fenómeno mediante la aplicación de técnicas de laboratorio, las cuales permitan, a su vez, evaluar la posible actividad coagulante de un Extracto Total en Etanol y fracciones obtenidas a partir de éste mediante una prueba de orientación global en coagulación.

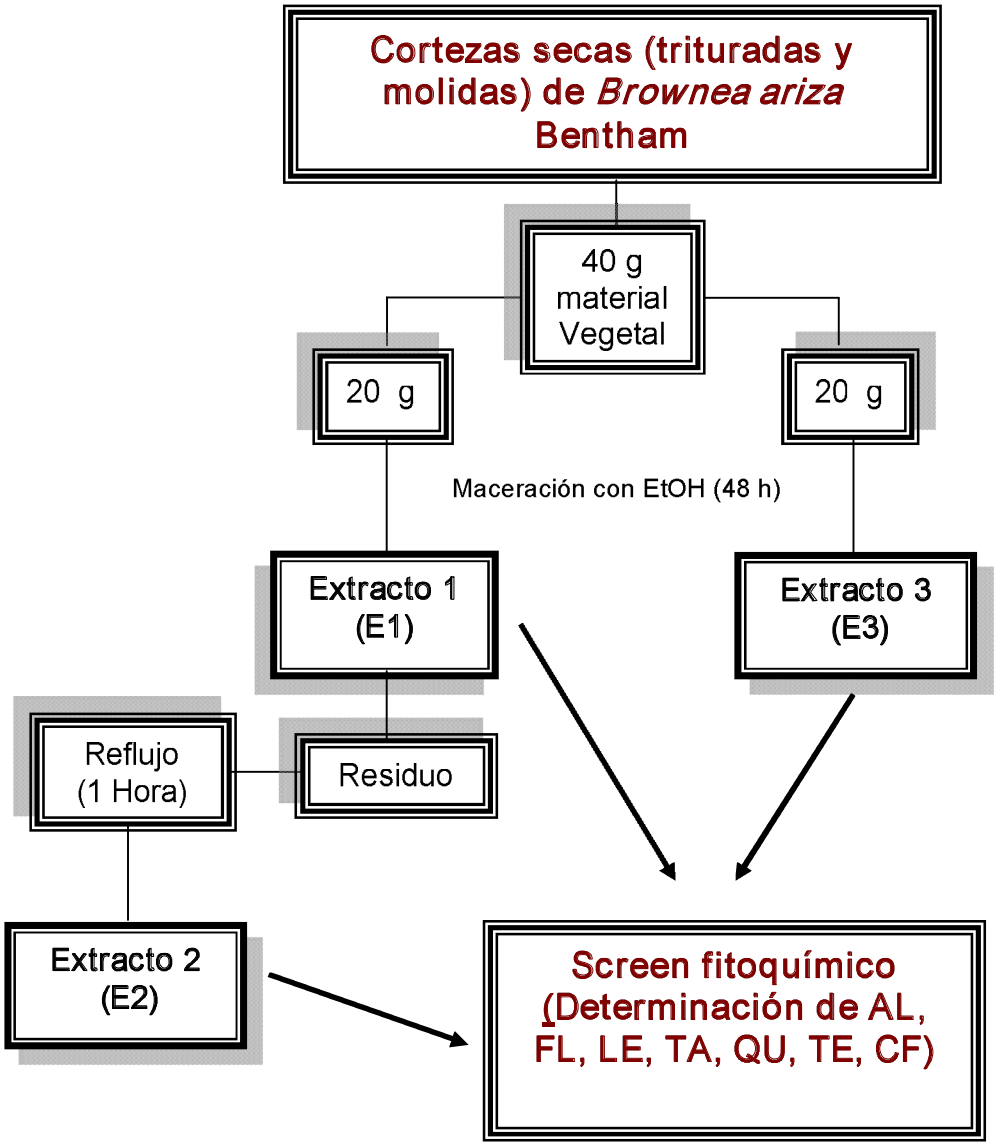
3.1 Material vegetal. La muestra vegetal (cortezas) se recolectó durante los meses de Julio y Agosto del año 2.003, en época de lluvia, en la finca "La Guajira" ubicada a 15 minutos del municipio de Sincé(Sucre). La corteza fue extraída de ramas jóvenes sanas; luego de un periodo de secado a temperatura ambiente fueron trituradas y molidas.

Además de la corteza, se recolectaron muestras de hojas, flores y legumbres de *Brownea ariza* Bentham (Caesalpiniaceae) con el fin de preparar tres ejemplares que fueron enviados al Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia para su reidentificación taxonómica, siendo determinada por el Curador General Julio Betancur bajo el número de radicación COL 502654 (**ANEXO 2**).

3.2 Screen fitoquímico. Se desarrolló la marcha fitoquímica cualitativa o screen fitoquímico propuesto por De la Rosa (2.003) para determinar los posibles metabolitos secundarios encontrados en la corteza seca de *Brownea ariza* Bentham. Para tal fin, se tomaron40 gramos de cortezas secas, trituradas y molidas de la especie vegetal, los cuales se dividieron en dos partes iguales (cada una con 20 g de material vegetal); luego, cada parte se sometió a extracción por maceración durante 48 horas, empleando como solvente etanol destilado. Al cabo de este tiempo, los macerados se filtraron, obteniéndose dos extractos líquidos codificados como Extracto 1 (E1) y

Extracto 3 (E3), pero únicamente al residuo de un solo macerado (E1) se le practicó extracción por reflujo durante tres horas, a partir de lo cual se obtuvo el extracto líquido codificado como Extracto (E2). En total se obtuvieron tres extractos en etanol, previa concentración en un rota evaporador a presión reducida y secado a temperatura ambiente.

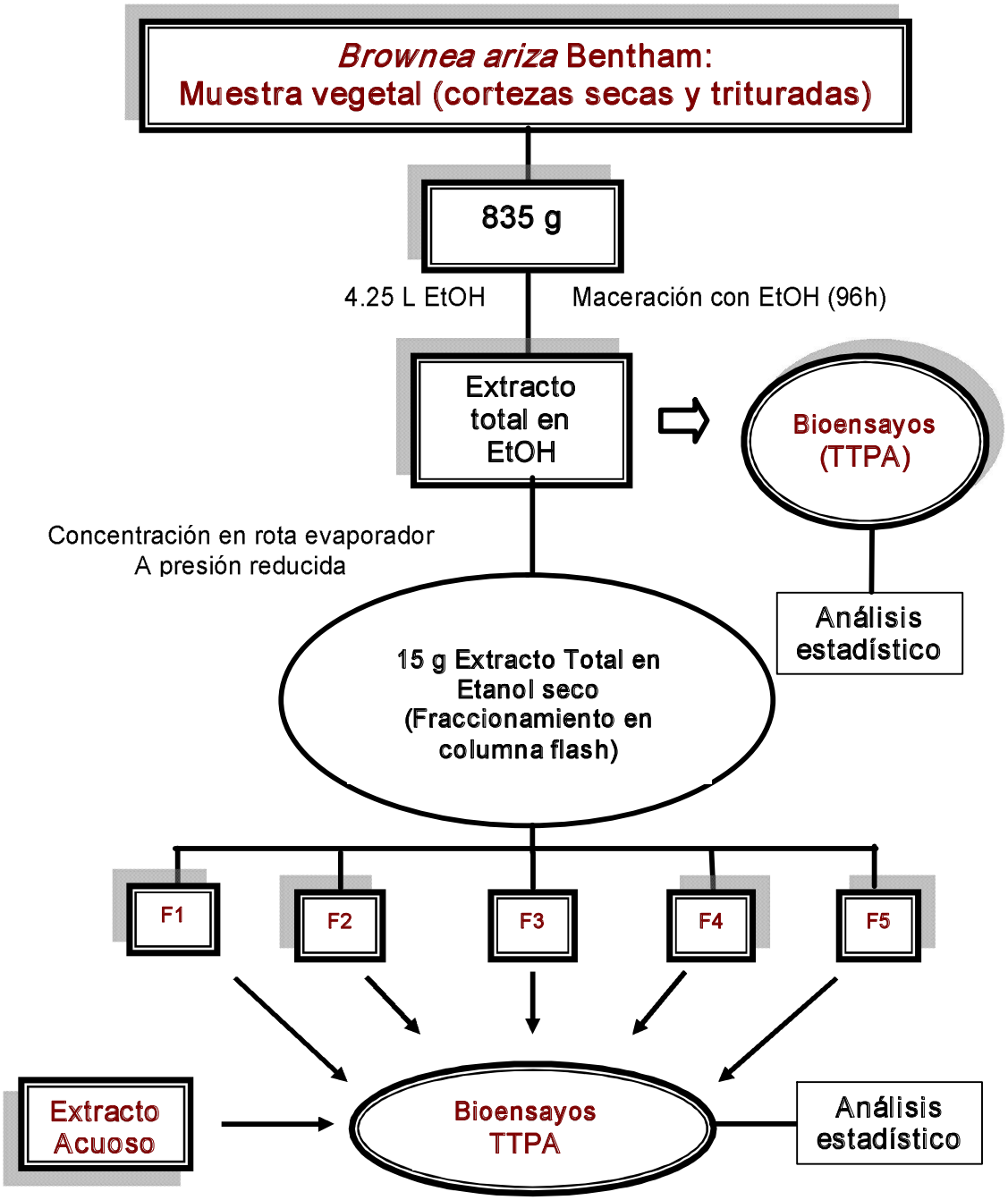
FIGURA 8. Screen Fitoquímico.



Se realizaron pruebas preliminares para alcaloides (AL) tomando 20 g. de hojas frescas resuspendidas en una solución de HCl al 2% (100 mL); se sometieron a calentamiento, tomando muestras a los 10, 30, 45 y 60 minutos. Los reactivos empleados para la confirmación de AL fueron: Mayer, Wagner, Hager, Dragendorff, y Ácido Fosfotúngstico.

3.3 Obtención del extracto total en etanol mediante maceración. 835 g. de corteza seca y triturada de *B. ariza* Bentham (**FIGURA 9**), fueron resuspendidas en 4,25 litros de etanol destilado en un frasco color ámbar, por un periodo de 96 horas (4 días). Al cabo de este tiempo, el macerado se filtró obteniéndose alrededor de 2,8 L de extracto en etanol, el cual se llevó a concentración en un rotaevaporador a presión reducida y secado a temperatura ambiente.

FIGURA 9. Esquema metodológico general.



3.4 Fraccionamiento del extracto total en etanol mediante columna flash. 15 g del Et fueron fraccionados mediante columna flash utilizando como fase estacionaria sílica gel $60GF_{254}$ y como fase móvil solventes en orden de polaridad creciente: Éter de Petróleo, Cloroformo, Acetato de Etilo, Etanol y Metanol.

3.5 Métodos Cromatográficos. Se realizaron Cromatografías en Capa Delgada (sobre portas de microscopio) para monitorear las fracciones obtenidas por medio de los solventes orgánicos empleados.

3.6 Obtención del Extracto Acuoso (Ea) mediante Extracción por Reflujo. Se tomaron 10 g de cortezas (secas y trituradas) y se depositaron en un balón fondo plano conteniendo 60 mL de agua destilada, montándose el equipo de extracción por reflujo durante 1 hora. Al cabo de este tiempo, se obtuvo alrededor de 40 mL de extracto acuoso de color rojo oscuro, el cual fue usado, posteriormente, para realizar los bioensayos.

3.7 Pruebas de coagulación. La actividad hemostática *in vitro* del extracto total en etanol, fracciones (**F1, F2, F3, F4** y **F5**) y extracto Acuoso fueron evaluados de acuerdo a una prueba de orientación global y de realización frecuente en el laboratorio de Hematología, propuesta y estandarizada por Forero y Forero (1998) del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia, con algunas variantes indicadas en el procedimiento recomendado por la casa fabricante (Wiener Lab.); prueba que por vez primera es aplicada a investigaciones que involucren productos naturales de origen vegetal.

3.7.1 Preparación de extractos. 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 el extracto y las fracciones con los

que se presentó enturbiamiento y/o solidificación en el plasma, se prepararon concentraciones de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL.

3.7.2 Muestras a analizar. Se trabajó *"in vitro"* con muestras de sangre donadas por tres pacientes (P1, P2, P3) voluntarios, no fumadores y sin problemas coagulatorios u otras patologías. La cantidad de sangre extraída fue de 25 mL por persona, utilizando agujas #20. Se usó citrato de sodio al 3,8 % como anticoagulante.

La muestra de sangre citratada se depositó en tubos de plástico y luego se centrifugó a 2.500 rpm durante 15 minutos obteniendo así plasma pobre en plaquetas (PPP).

3.7.3 Controles (Testigos). Para la técnica Tiempo de tromboplastina Parcial Activada se emplearon como controles positivos el reactivo de Tromboplastina Parcial Activada (TPA) 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.

3.7.4 Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA). Se realizó la técnica de acuerdo al procedimiento recomendado por la casa fabricante del reactivo (control). Se procedió a modificar la técnica reemplazando, primero, el reactivo de TPA **(ANEXO 4** y segundo, el $CaCl_2$ (**ANEXO 5** por las concentraciones del Et, Extracto acuoso y fracciones. Cada prueba se realizó por duplicado. El procedimiento de la prueba (control positivo) fue el siguiente:

- Precalentar el $CaCl_2$ antes de realizar la prueba en baño serológico a 37 ºC.

- En un tubo plástico colocar: 100 μL de plasma y 100 μL de reactivo de TPA.
- Mezclar e incubar durante 3 minutos a 37 ºC.
- Agregar 100 μL de $CaCl_2$ y disparar simultáneamente el cronómetro.
- Agitar brevemente para homogeneizar el contenido, mantener en el baño unos 25 segundos.
- Sacar el tubo del baño, inclinar suavemente una vez por segundo y detener el cronómetro en el momento de la formación del coágulo.
- Tomar nota del tiempo de coagulación (en segundos).

3.8 ANALISIS ESTADÍSTICO. Se ensayaron dos variables: tiempo en segundos (variable dependiente) vs concentración en mg/mL (variable independiente). Se realizó, primero, un análisis descriptivo hallando la Media, Desviación Estándar y el Coeficiente de Variación de los datos registrados en la prueba (**ANEXO 3)**, hecha por duplicado. Siguió un análisis de correlación entre las dos variables con el fin de establecer la relación existente entre éstas, determinándose la significación con base a la estadística de prueba ***t***, tomando valores de α específicos: para el Et un α = 0.20 (1.638), para **F**4 un α = 0.10 (2.353) y para **F5** un α = 0.05 (3.182), rechazándose la hipótesis nula cuando $p \neq 0$. Los niveles de correlación registrados que evidencian la relación entre el Extracto o las Fracciones obtenidas y los tiempos de coagulación, difieren apreciablemente en sus valores. Esta eventualidad obliga al empleo de niveles de significación consecuentemente distintos, para corroborar con acierto la relación anteriormente expuesta. Luego, un análisis de regresión lineal para tratar de determinar el comportamiento de dichas variables. Finalmente, un análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional para tamaños de muestras iguales, que establecerá si existían diferencias significativas entre las medias de los tres pacientes ensayados, aceptándose la hipótesis nula cuando $p < 0.05$ (Triola, 2000).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Screen fitoquímico. El Screen Fitoquímico dio positivo para Flavonoides, Leucoantocianinas, Compuestos con Hidroxilos Fenólicos, Taninos, Terpenos y/o Esteroides y Quinonas; la presencia de Leucoantocianinas coincide con lo reportado en la fitoquímica de las Leguminales (Domínguez, 1973; Gupta, 1995). Con respecto a la presencia de los demás metabolitos secundarios (CF, TA y TE y/o ES), es éste el primer reporte en dar a conocer estos núcleos básicos en *Brownea ariza* Bentham, en la que hasta el momento no se habían presentado este tipo de resultado (**TABLA 2).**

TABLA 2. Metabolitos secundarios identificados (preliminarmente) en la corteza seca de *Brownea ariza* Bentham mediante Screen Fitoquímico.

Metabolito Secundario	Pruebas	Primer Screen	Segundo Screen	Tercer Screen	Resultado final
FL	Shinoda	+	+	–	+
LE	Rosenheim	+	+	+	+
CF	$FeCl_3$	+	+	+	+
TA	Gelatina-sal	–	+	+	+
TE y/o ES	Lieberman-Burchard	+	+	+	+
AL	Mayer, Wagner, Hager, Dragendorff y Ac. Fosfotungstico	–	–	–	–
QU	Bortranger	+	+	+	+

En vista de la no presencia de Alcaloides en la corteza seca de *Brownea ariza* Bentham,se realizaron pruebas para la identificación de este metabolito secundario en hojas frescas de dicha especie vegetal. Luego de someter a diferentes temperaturas la solución de HCl al 2% más la muestra de material vegetal, la prueba se consideró positiva en hojas frescas, ya que tres de las pruebas realizadas lo confirman, resultado que coincide con lo reportado por Domínguez (1973) acerca de la detección de este tipo de metabolito secundario en el orden Leguminales (**TABLA 3).** El rendimiento y la cantidad en gramos obtenida de cada extracto (E1, E2, E3) se indican en la **TABLA 4**.

TABLA 3. Pruebas preliminares para identificación de AL en hojas frescas de *Brownea ariza* Bentham en solución de HCl al 2%, tomando muestras a diferentes tiempos.

Pruebas	**10'**	**30'**	**45'**	**60'**	**Resultado**
Wagner	–	+	–	–	–
Hager	–	–	+	–	–
Mayer	–	+	+	+	+
Dragendorff	–	+	+	+	+
Ac. Fosfotúngstico	+	+	+	+	+

TABLA 4. Cantidad en gramos y Rendimiento calculado por cada extracto empleado en el screen fitoquímico.

Extracto	Peso (en g)	Rendimiento (R)
E1	3,2	16%
E2 (Reflujo)	1,8	9%
E3	3,5	17,5%

La presencia de FL, LE, CF, TA, TE, ES y QU en la corteza seca de B. ariza Bentham es consistente si se tiene en cuenta la biogénesis de éstos, ya que presentan un precursor común como lo es el ácido pirúvico y la acetilcoenzima A, cuyo metabolismo da pie a la producción de un metabolito secundario en especial. Comparando estos resultados con la presencia de AL en hojas frescas, se puede argüir que la ruta biogenética que sigue a los metabolitos primeramente mencionados, es la síntesis de AL, ya sea por medio de malonil coenzima A, ácido mevalónico, o bien, a través de de la ruta del ácido shikímico (Valencia,1995).

4.2 Obtención de Fracciones. El fraccionamiento en Cromatografía en Columna Flash se hizo a partir de 15 g tomados de la cantidad de 163.5 g de Extracto Total en Etanol obtenida {Rendimiento (R) = 19,58 %)}, empleando cinco solventes orgánicos en orden de polaridad creciente. En total se obtuvieron 5 Fracciones codificadas como F1, F2, F3, F4, F5, las cuales se sometieron a concentración en un rota evaporador a presión reducida y en una campana de vacio para eliminar totalmente el solvente orgánico (**TABLA 5**).

TABLA 5. Características de los extractos obtenidos a partir del extracto total en etanol (Et).

Extracto	**Cantidad** en g	**Color**	**R** (con respecto a los 15 g fraccionados)
Fracción 1 (F1)	2,2	Verde Pasto	14,6%
Fracción 2 (F2)	1,1	Verde intenso	7,3%
Fracción 3 (F3)	1,2	Verde pálido	8%
Fracción 4 (F4)	2,4	Rojo ladrillo	16%
Fracción 5 (F5)	2	Rojo intenso	13,3%

4.3 Métodos Cromatográficos. Se monitorearon mediante Cromatografía en Capa Delgada (CCD) las cinco fracciones obtenidas a partir del Extracto Total en Etanol (Et) con solventes de variada polaridad (fases móviles), seleccionándose aquellos que permitieran una mejor y mayor separación en bandas a una determinada proporción, revelando con vapores de Yodo y vainillina/H_2SO_4 . Para el caso particular de la **F4** y **F5**, no se encontró una fase móvil que permitiera una buena separación. En la **FIGURA 10** se muestran los resultados de la CCD realizada a la **F1, F2** y **F3** y en la **TABLA 6** los recorridos de la muestra (Rf) por cada banda.

FIGURA 10. CCD con sílica gel (fase estacionaria) realizadas a la **F1, F2** y **F3** con fases móviles Eter de petróleo: Acetona (V/V) en proporción 8:2, 8:2 y 6:4, respectivamente; el revelado se hizo con vainillina/H_2SO_4. Cada banda mostró un color en particular y enumeradas da abajo hacia arriba).

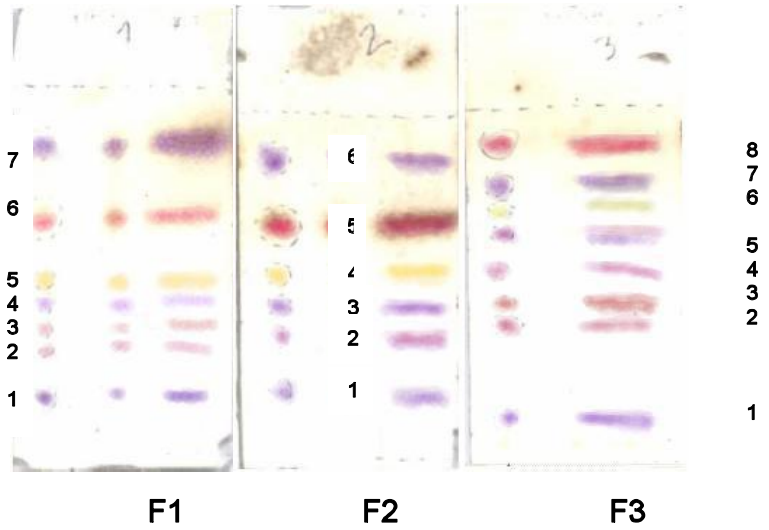


TABLA 6. Recorridos de la muestra (Rf) en Cm anotados por cada banda (enumeradas de abajo hacia arriba) de la **F1, F2** y **F3.**

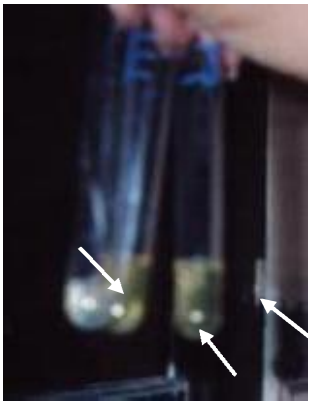
F1 (Número de Banda)	Rf	F2 (Número de Banda)	Rf	F3 (Número de Banda)	Rf
1	0.153	1	0.170	1	0.117
2	0.269	2	0.340	2	0.392
3	0.307	3	0.425	3	0.450
4	0.403	4	0.531	4	0.549
5	0.461	5	0.680	5	0.666
6	0.634	6	0.872	6	0.725
7	0.826			7	0.784
				8	0.921

4.4 Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada. En un principio se quiso evaluar si el extracto total en etanol (Et), extracto acuoso y fracciones a una

concentración de 500 mg/mL podrían presentar efecto coagulante en PPP por el mecanismo de la vía intrínseca de la coagulación, en reemplazo del reactivo de TPA. Los resultados no mostraron cualquiera de las dos características a considerarse como positivas (enturbiamiento y/o solidificación) **(FIGURA 11)**, situación que podría explicarse si se tiene en cuenta que la técnica TTPA no arroja resultados esperados mientras no esté actuando la tromboplastina parcial activada en presencia de calcio iónico (Forero y Forero, 1998).

FIGURA 11. Reacción de formación del coágulo de fibrina (indicada con flechas) en muestras de plasma control (positivo).

.



Posteriormente, se decidió reemplazar el $CaCl_2$ por las anteriores concentraciones. Se pudo apreciar solidificación y/o enturbiamiento solamente con el Et, **F4** y **F5** a intervalos diferentes **(TABLA 7) (FIGURA 12).** Una vez realizadas las pruebas empleando las concentraciones de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL, se anotó el tiempo promedio en darse la reacción de formación del coágulo de fibrina, valores indicados en la **TABLA 8 (FIGURA 13) (ANEXO 3).** El procesamiento de la información se realizó a través de un formato estadístico diseñado en Excel (**ANEXOS 6 y 7).**

TABLA 7. Resultados de la primera experiencia de la técnica TTPA reemplazando el $CaCl_2$ por la concentración de 500 mg/mL del Extracto Total en Etanol (Et), Extracto acuoso y fracciones, registrándose valores solamente en tres de ellos.

Muestras	Tiempo		
	P1	P2	P3
Et	15,01	16,31	15,21
F1	-	-	-
F2	-	-	-
F3	-	-	-
F4	36,16	35,03	36,27
F5	70,11	66,45	53,08
Extracto acuoso	-	-	-

FIGURA 12. Formación del coágulo de fibrina en plasma, empleando la concentración de 500 mg/mL del Et, **F4** y **F5.**

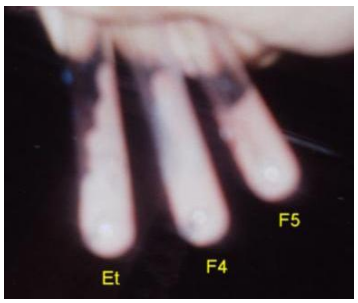


FIGURA 13. Reacción positiva (solidificación) de formación de fibrina en plasma, empleando las concentraciones de 250 y 1 mg/mL del Et, **F4** y **F5.**

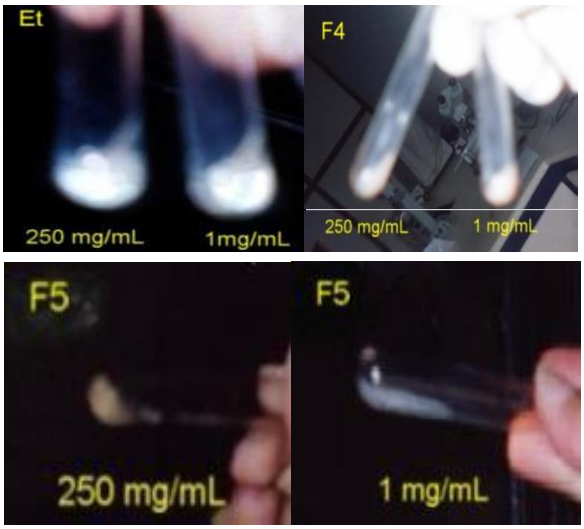


TABLA 8. Resultados de la segunda experiencia de la técnica TTPA reemplazando el $CaCl_2$, indicándose los tiempos (promedios) de cada paciente usando las concentraciones (mg/mL) del Extracto total en etanol, **F4** y **F5**.

Muestras	Concentración (mg/mL)	Tiempo (segundos		
		P1	P2	P3
Extracto total en etanol	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 4 (F4)	500	35,20	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 5 (F5)	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

Los duplicados de cada prueba, arrojaron coeficientes de variación que no sobrepasaron el 5%, siendo los datos aceptados por la mínima variación presentada entre ellos (**ANEXO 3).** Seguidamente, el análisis de correlación lineal realizado para el Et, **F4** y **F5** entre las variables analizadas (tiempo vs concentración) demostraron una correlación cercana a 1 y -1, según se indica en la **TABLA 9**.

TABLA 9. Correlación registrada en cada paciente usando un determinado extracto.

Muestras	**Correlación (*r*)**		
	P1	**P2**	**P3**
Et	-0.905	-0.846	-0.785
F4	-0.881	-0.934	-0.870
F5	0.993	0.998	0.880

Esto sugería una correlación alta, sin embargo, al comprobar el nivel de significancia se obtuvo que para los valores de α indicados en la **TABLA 10**, la estadística de prueba ***t*** obtenida de cada paciente usando el Et, **F4** y **F5**, excedía al punto crítico o valor de tabla (**TABLA 11**), por lo tanto se rechazaba la hipótesis nula acerca de no haber correlación lineal significativa ya que los indicios eran suficientes para apoyar la afirmación de que verdaderamente existía entre el tiempo requerido para la formación del coágulo de fibrina y la concentración ensayada.

TABLA 10. Valores de α usados para la estadística de prueba ***t***.

Muestras	Estadística de prueba ***t***		
	P1 (α = 0.20)	**P2 (α = 0.10)**	**P3 (α = 0.05)**
Et	-3.694	-2.753	2.196
F4	-3.227	-4.544	-3.067
F5	15.084	27.109	3.223

TABLA 11. Puntos criticos o valores de tabla usados en la estadística de prueba *t*.

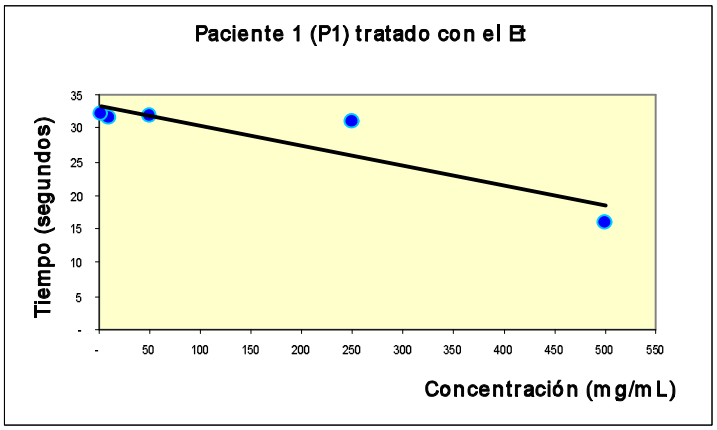
Puntos críticos o valores de tabla		
Et (α = 0,20)	**F4 (α = 0,10)**	**F5 (α = 0,05)**
1,638	2,354	3,182

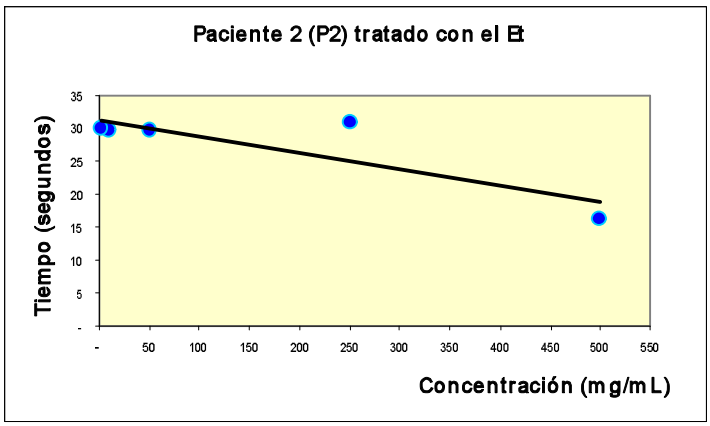
El análisis de regresión lineal mostró gráficas para cada paciente usando el Et, **F4** y **F5**, cuyos error estándar estimado (Se) **(TABLA 11)** indicaron que los valores al ser pequeños (tiempo de formación del coágulo de fibrina), reflejaban puntos que se mantenían cerca de la línea de tendencia. Con respecto al comportamiento presentado por el **Et**, se observó solidificación en el PPP empleando la concentración más alta a un tiempo muy inferior comparado con el tiempo registrado por el control positivo, cuya línea de tendencia se registró en sentido negativo, mostrando un comportamiento inversamente proporcional a la Concentración (**FIGURA 14**).

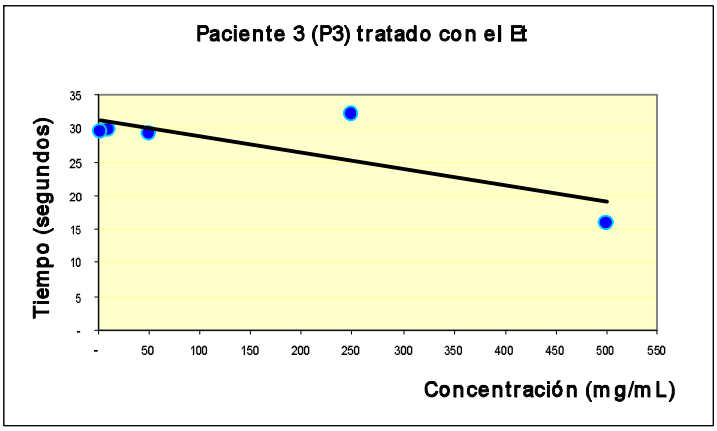
TABLA 12. Error estándar estimado (Se) calculado a partir de los datos registrados en cada paciente.

Muestras	**Error estándar estimado (Se)**		
	P1	**P2**	**P3**
Et	4.574	3.852	4.691
F4	4.574	3.720	5.637
F5	2.773	0.924	5.091

FIGURA 14. Gráficas de regresión lineal indicándose la línea de tendencia central (en sentido negativo) con respecto a los valores (representados por puntos azules) registrados por el P1, P2 y P3 usando el Et.

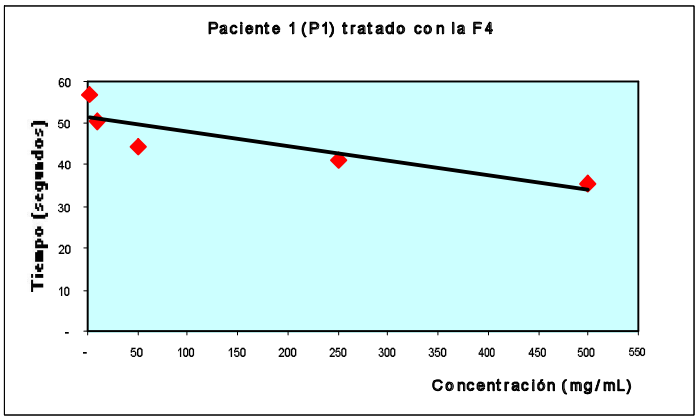


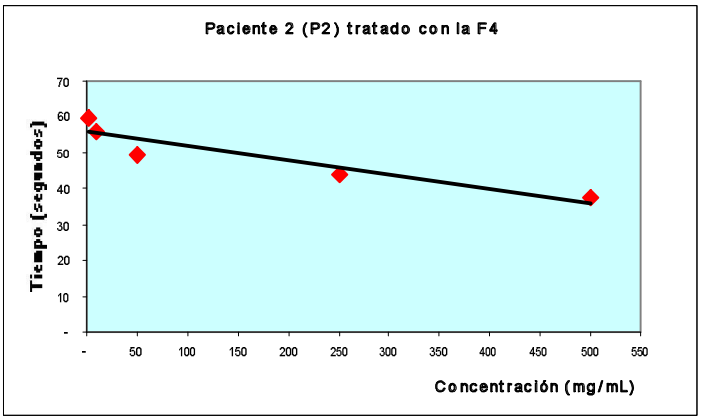


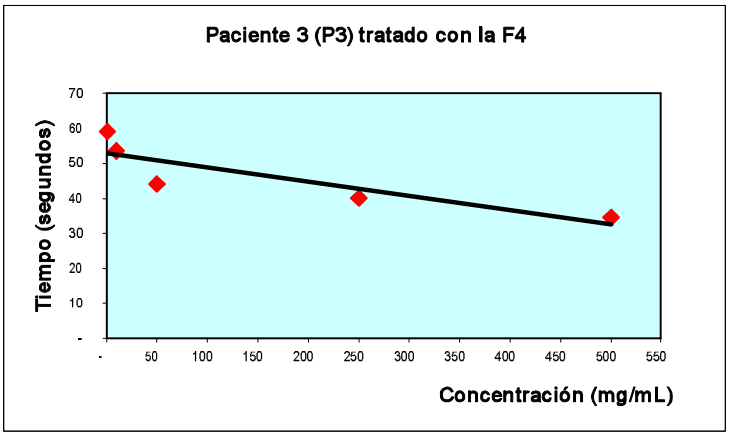


A pesar que con **F4** se presentó una línea de regresión en sentido negativo (igual como con el Et), el tiempo registrado empleando la mayor concentración quedó incluido dentro de los lapsos citados por la literatura (33 – 48 segundos). Estos resultados se presentaron en forma inversa proporcional a la concentración, lo cual es consistente con el hecho de que al estar en una concentración alta, los metabolitos secundarios, posiblemente, intervienen facilitando la reacción de coagulación que ocurre "*in vitro*". (**FIGURA 15**).

FIGURA 15. Gráficas de regresión lineal indicándose la línea de tendencia central (en sentido negativo) con respecto a los valores (representados por puntos rojos) registrados por el P1, P2 y P3 usando la **F4**.

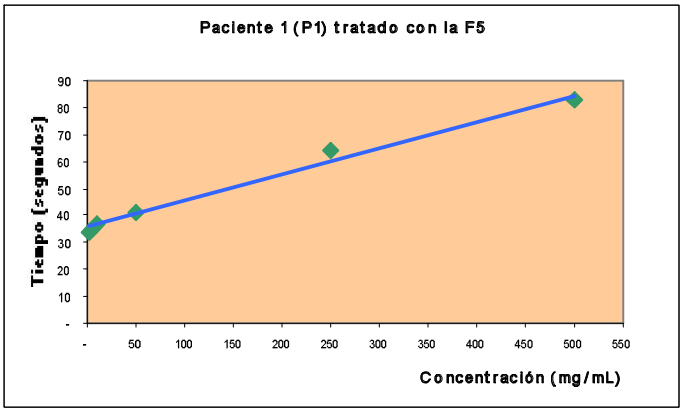


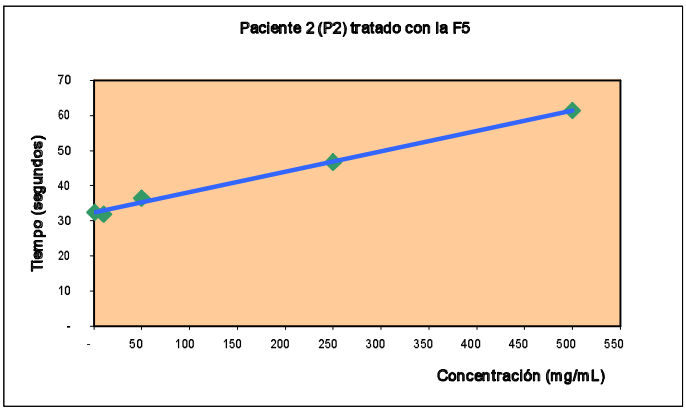


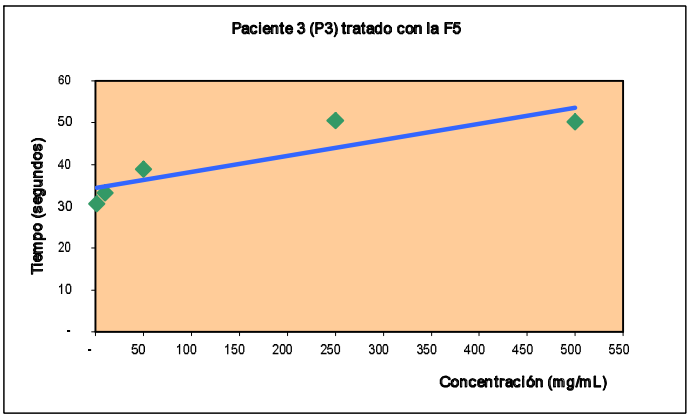


Con **F5** la línea de regresión fue positiva, es decir, en forma directa proporcional a la concentración (**FIGURA 16**), resultados que son sorprendentes ya que lo lógico sería esperar un comportamiento similar al ocurrido con el **Et** y **F4** lo que desde el punto de vista farmacológico es interesante ya que se presenta la formación del coágulo de fibrina en un tiempo cercano al citado en la literatura (33 – 48 segundos) utilizando la concentración mínima del experimento (P1 33.85 segundos; P2 32.40 segundos; P3 30.59 segundos). Asimismo, se deja abierta la inquietud con respecto al tipo de sustancias presentes en el Et, **F4** y **F5,** y más específicamente sobre aquel metabolito secundario al que pueda atribuirse la actividad en cuestión.

FIGURA 16. Gráficas de regresión lineal indicándose la línea de tendencia central (en sentido positivo) con respecto a los valores (representados por puntos verdes) registrados por el P1, P2 y P3 usando la **F5**.







Al realizar la comparación de las medias a través de un análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional (**TABLA 13**), en general no se encontraron cambios estadísticamente significativos con respecto al tiempo en darse la reacción de formación del coágulo de fibrina en muestras de plasma de los tres pacientes ensayados. Desde el punto de vista estadístico, los tres valores hallados (o estadístico de prueba) del Et, **F4** y **F5** no excedían al punto crítico, por lo tanto quedaban en el área bajo la curva que va desde 0 hasta 3.883 (α =0.05), demostrándose que la actividad de los extractos a una determinada concentración fue igual en muestras de plasma obtenida de sangre extraída de pacientes diferentes, por lo que las sustancias o metabolitos secundarios presentes en el extracto y fracciones actuarían de forma similar independiente de la persona seleccionada.

TABLA 13. Valores calculados a partir del análisis de la varianza (ANOVA) realizado a los pacientes 1,2 y 3 tratados con el **Et, F4** y **F5.**

Muestras	Valor calculado (ANOVA)
Et	0.054
F4	0.230
F5	0.774

El calcio es fundamental para que ocurra la activación del factor X en FXa (tanto por la vía intrínseca como por la vía extrínseca), con la consiguiente activación de la protrombina en su forma activa trombina, formándose finalmente la fibrina (Forero y Forero, 1998; ILADIBA, 2000). Con respecto a la decisión de reemplazar el Cloruro de Calcio por las concentraciones ensayadas, se sospecha que los metabolitos secundarios presentes en el Et, **F4** y **F5** podrían potenciar o de alguna manera desempeñar el papel que el Calcio desempeña dentro del proceso de coagulación sanguínea *"in vitro",* afirmación que es respaldada por los resultados demostrados estadísticamente y registrados de la prueba TTPA.

La evaluación de la actividad coagulante de *Brownea ariza* Bentham especialmente del Extracto Total en Etanol (Et) y Fracciones 4 y 5 (F4 y F5) obtenidas de la corteza seca, permiten validar la información tomada de la medicina tradicional, contribuyendo así al correcto uso que ciertas comunidades dan a ésta y a muchas otras especies de importancia médica. Lo anterior implica no sólo continuar con investigaciones que reafirmen los datos hasta aquí obtenidos, sino tratar de explorar los puntos de acción de los constituyentes de *B. ariza* en la casaca de coagulación sanguínea; asimismo, se deja abierta la necesidad de continuar enriqueciendo el conocimiento científico sobre *Brownea ariza* Bentham y la posible utilidad de sus metabolitos secundarios en farmacología, considerándose éste como el primer informe en dar a conocer experimentalmente su utilidad como coagulante de origen vegetal.

CONCLUSIONES

- La extracción por maceración y el fraccionamiento en columna flash fueron técnicas apropiadas en la obtención del Extracto Total en Etanol (Et) y Fracciones para la evaluación de la actividad coagulante de *Brownea ariza* Bentham.

- De la corteza seca de *Brownea ariza* Bentham se determinaron cualitativa y preliminarmente metabolitos secundarios tales como Flavonoides, Leucoantocianinas, Compuestos fenólicos, Terpenos, Taninos y Quinonas.

- El Extracto Total en Etanol (**Et**), Fracción 4 (**F4**) y Fracción 5 (**F5**) influyeron en la formación del coágulo de fibrina *"in vitro"* en tiempos diferentes usando concentraciones de 500, 250, 50, 10 y 1 mg/mL, respectivamente.

- Las variables analizadas [Tiempo (s) vs concentración (mg/mL)] mostraron una correlación lineal significativa y valores próximos a la línea de tendencia, sin cambios significativos entre las medias de los pacientes ensayados.

- Para **F5** la formación del coágulo de fibrina ocurrió en forma directa proporcional a la concentración, en tanto que para **F4** y el **Et** sucedió en forma inversa.

- Posiblemente las sustancias presentes en el **Et**, **F4** y **F5** potencian el mecanismo de la coagulación *"in vitro"* por la vía intrínseca, reforzando de alguna manera la participación del calcio en la activación de los factores implicados en dicho proceso.

RECOMENDACIONES

- Sería interesante tratar de determinar las estructuras de las sustancias aisladas del extracto total en etanol (Et) y fracciones de la corteza seca de *Brownea ariza* Bentham.

- Continuar evaluando extractos obtenidos de otras partes de la planta como podrían ser las hojas, flores y madera ya que los estudios sobre éstos son escasos.

- Realizar investigaciones con el fin de evaluar actividades biológicas tales como: Neutralizadora del veneno de serpientes, cicatrizante y laxante.

- Ensayar con las sustancias cuyos resultados sean positivos en animales de experimentación con los cuales se logre demostrar el efecto directo sobre coagulopatías, especialmente en casos de hemofilia.

REFERENCIAS

Alam, M.I., Gómez, A. Indian medicinal plants active against Elapide and Snake venoms. En: Otero *et al* (2000): Snakebiets and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. Journal of Ethnopharmacology; 73: 233 – 241.

Alam, M.I., Auddy, B., Gómez, A. (1994): Isolation, purification and partial characterization of viper venom inhibiting factor from the root extract of the indian medicinal plant Sarsaparilla (*H. Indicus* R. Br.). toxicon, 32: 1551- 1557. En: Otero *et al* (2000): Snakebiets and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of Bothrops atrox venom. Journal of Ethnopharmacology; 73: 233 – 241.

Bruneton, Jean. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 2da edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, 1991. Pag. 9 -11.

Casas, Antonio *et al.* Laboratorio clínico de Hematología. Editorial McGraw – Hill Interamericana. 1ra edición. Madrid, 1994. Pag. 172 – 206; 292 – 313.

Curtis, Helena. Principios de Biología. Editorial Panamericana. México, 1995. Pag. 761-764.

Crowther, Mark *et al* (2002): Oral vitamin K lowers the international normalized ratio more rapidly than subcutaneous vitamin k in the treatment of warfarin- associated coagulopathy. Annals of Internal Medicine., 137(4): 251-254.

De Jonge *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. Inmunol, 2003; 10(3): 495-497.

De la Rosa, Catalino. Cromatografía y marcha fitoquímica cualitativa. Universidad del Atlántico. Departamento de Química. Barranquilla, 2003.

De Marcano D., Hasegawa, M. Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. 1ra edición. Caracas, 1991.

Domínguez, Xorge. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México, 1973. Pag. 15-47.

Duke, j. Phytochemical and Ethnobotanical Databases, 1998. Disponible en: www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/ethnobotuse.pl.

Enciclopedia Microsoft Encarta 2002. 1993-2001 Microsoft Corporation.

Forero, Yibbi. Forero, A. Manual de procedimientos en coagulación. Garantía de calidad. INS. 1ra edición. Santa Fe de Bogotá, 1998.

García B, Hernando. Flora medicinal de Colombia. Tercer Mundo editores. Tomo 1. 2da edición. Bogotá, 1992. Pag. 438-444.

Gauntlett, Patricia. Myers, L. Enfermería: Principios y práctica. Editorial Médica Panamericana. Tomo 2. Madrid, 1993. pag. 803-805.

Gros Eduardo, Seldes Alicia y Burton Gerardo. Introducción al estudio de los Productos Naturales. Secretaria General de la OEA. Washington, D.C, 1985.

Gupta, Mahabair. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Editores Presencia Ltda. 1ra edición. Santa Fe de Bogotá, 1995. Pag. 348-350.

Heller, S. R. Annal Chem. 1972. En: Valencia, Ciria. Fundamentos de Fitoquímica. 1ra edición. México, 1995. Pag.16-29.

ILADIBA. Volumen XV. 10: 9 – 14, 2001.

Kits APTTest. Wiener Laboratorios SAIC. Rosario- Argentina, 2000.

Kosel, Carlos. Guía de medicina natural: Salud y curación. Editorial De la misión de la verdad presente. 9na edición. Madrid, 1980.Pag.7-9.

Mabberley D.J. The plant book. A portable dictionary of the higher plans. Cambridge University Press. 1987.

Machado, Leandro. Control de Calidad de productos fitoterapéuticos. Bogotá, 1996. Pag. 157-176.

Muñoz, Alberto. Plantas medicinales: Su utilización práctica. Tercer Mundo editores. Bogotá, 1994.

Ning Xu *et al* (1998): Association of vitamin K- dependent coagulation proteins and C4b binding protein with triglyceride-rich lipoproteins of human plasma. Arteriorsclerosis , Thrombosis and vascular Biology., 18: 33-39.

Otero *et al* (2000): Snakebiets and ethnobotany in the northwest Region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of Bothrops atrox venom. Journal of Ethnopharmacology; 73: 233 – 241.

Pasto, Daniel & Johnson, Carl. Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverté S.A. 1ra edición en español. España, 1981.

Pérez-Arbeláez, E. Plantas útiles de Colombia. Editorial Víctor Hugo. 14ta edición. Medellín, 1990. Pag. 268.

Pomilio, Alicia & Vitale, Arturo. Métodos experimentales de laboratorio en Química orgánica. Secretaría general de la OEA. Washington, 1998. Pag. 43-44.

Riewald, Matthias & Ruf, Wolfram. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. PNAS, 2001; 98(14): 7742-7747.

Rosenthaler, L. (1930): The chemical investigation of plants. En: De la Rosa, Catalino. Estudio Fitoquímico de *Fagara rhoidolia*. Tesis de maestría. Universidad del Valle, 1982.

Schumaker, O. (1996): Some observations on anthocyanin metabolism in the leaves of *Brownea grandiceps* Bull. En: Gupta, Mahabair. 270 plantas medicinales iberoamericanas. Editores Presencia Ltda. 1ra edición. Santa Fe de Bogotá, 1995. Pag. 348-350.

Spronk *et al* (2000): Novel mutation in the γ-glutamyl carboxylase gene resulting in congenital combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. BLOOD., 96(10): 3650-3652.

Strasburger A., Tratado de Botánica, 6º Edición. Barcelona, Marín S.A.; 1974.

Suh, T. *et al* (1995): Resolution of spontaneous bleeding events but failure of pregnancy in fibrinogen-deficient mice. J.Gen. & Dev., 9: 2020-2033.

Triola, Mario. Estadística elemental. Pearson educación. Séptima edición. México, 2000. Capítulos 1, 9 y 11.

Uribe H., Cristina. Flora del Llano. Naturaleza de la Orinoquía. Cristina Uribe Editores. Primera edición. Bogotá, 1997.

Uribe, Misael. Tratado de medicina interna. Editorial Médica Panamericana. 2da edición. Tomo 2. México, 1995. Pag.1209-1211.

Valencia, Ciria. Fundamentos de Fitoquímica. 1ra edición. México, 1995. Pag.16-29.

La sangre: El fluido dador de la vida. Disponible en:
www.harunyahya.com/es/naturaleza07.phb

Bacterias fijadoras de Nitrógeno. Disponible en:
www.wisard.org/wisard/shared/asp/projectssummary.asp?kennummer=3990.

Familia Fabaceae. Disponible en:
www.puc.cl/sw_educ/hort0498/HTML/p021.html

Plantas medicinales y diabéticas. Disponible en:
www.iqb.es/D_Mellitus/medicinas/plantas04.htm

Leguminosas arbóreas y arbustivas. Disponible en:
www.chlorischile.cl/leguminosas/jmres.hrm

Caesalpiniaceae. Dispoible en:
www.unex.es/botanica/LHB/rosidae/caesalpi.htm
www.arbolesornamentales.com/Caesalpiniaceae.htm

ANEXOS

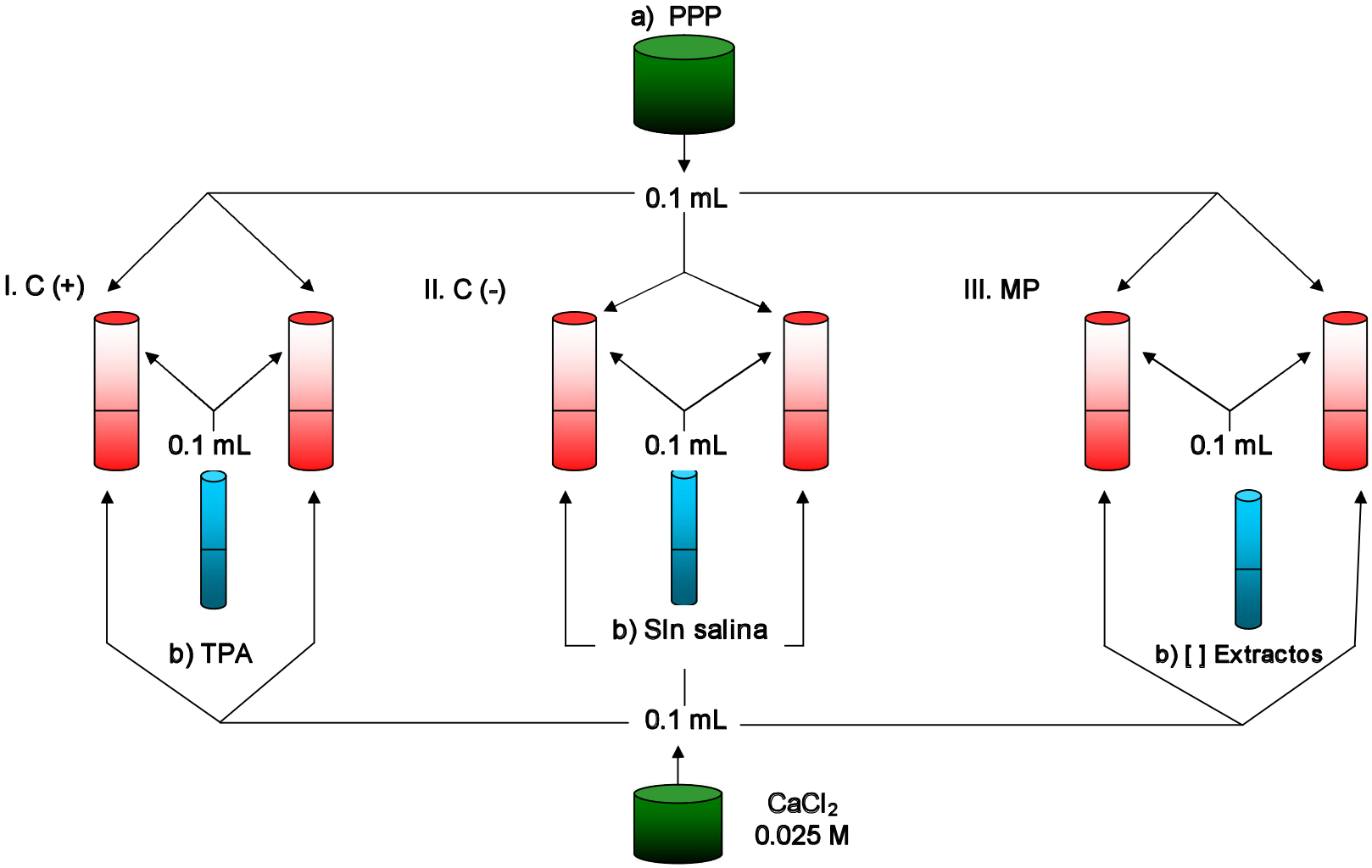
ANEXO 1. Encuesta etnofarmacológica realizada a 40 personas conocedoras y practicantes con plantas medicinales del municipio de Sincé, Corozal, Galeras y corregimientos vecinos (Palomo, Punta de Blanco y Puerto Franco) durante los meses de Marzo y Abril del año 2003. Se muestran los nombres vulgares de las plantas para tratar hemorragias u otras enfermedades (indicadas entre paréntesis), así como también el tipo de preparación y aplicación de las mismas. (Encuesta realizada por los estudiantes de Biología Emilio José Arrieta y Juan C. Villalba, autores del presente trabajo).

Plantas Medicinales	**Plantas utilizadas en Hemorragias**	**Preparación de la planta**	**Aplicación de la planta**
Arizá	**Si**	Infusión en agua caliente	Vía oral
Hamamelis	**Si**	Cataplasma	Vía externa
Hidrastide del Canadá	**No** (Gripe, Diarrea, Infección en Riñones)	Cataplasma	Fricción
Cajeto	**Si**	Infusión en agua caliente	Vía oral
Muérdago	**No** (Tratamiento de Ulceras)	Infusión en agua fría	Via oral
Ojo de Buey	**No** (Cólicos, Alergias)	Cataplasma	Vïa oral, Baños, Via externa
Cocuelo	**Si**	Infusión en agua caliente	Vía oral, Fricción,
Raiján	**No** (Rasquiñas en la piel)	Cataplasma	Vía externa
Papayote	**Si**	Infusión en agua caliente	Vía oral
Cafelillo	**Si**	Cataplasma	Vía externa
Sangregao	**Si**	Cataplasma	Vía externa
Verdolaga Blanca	**Si**	Infusión en agua caliente	Vía oral

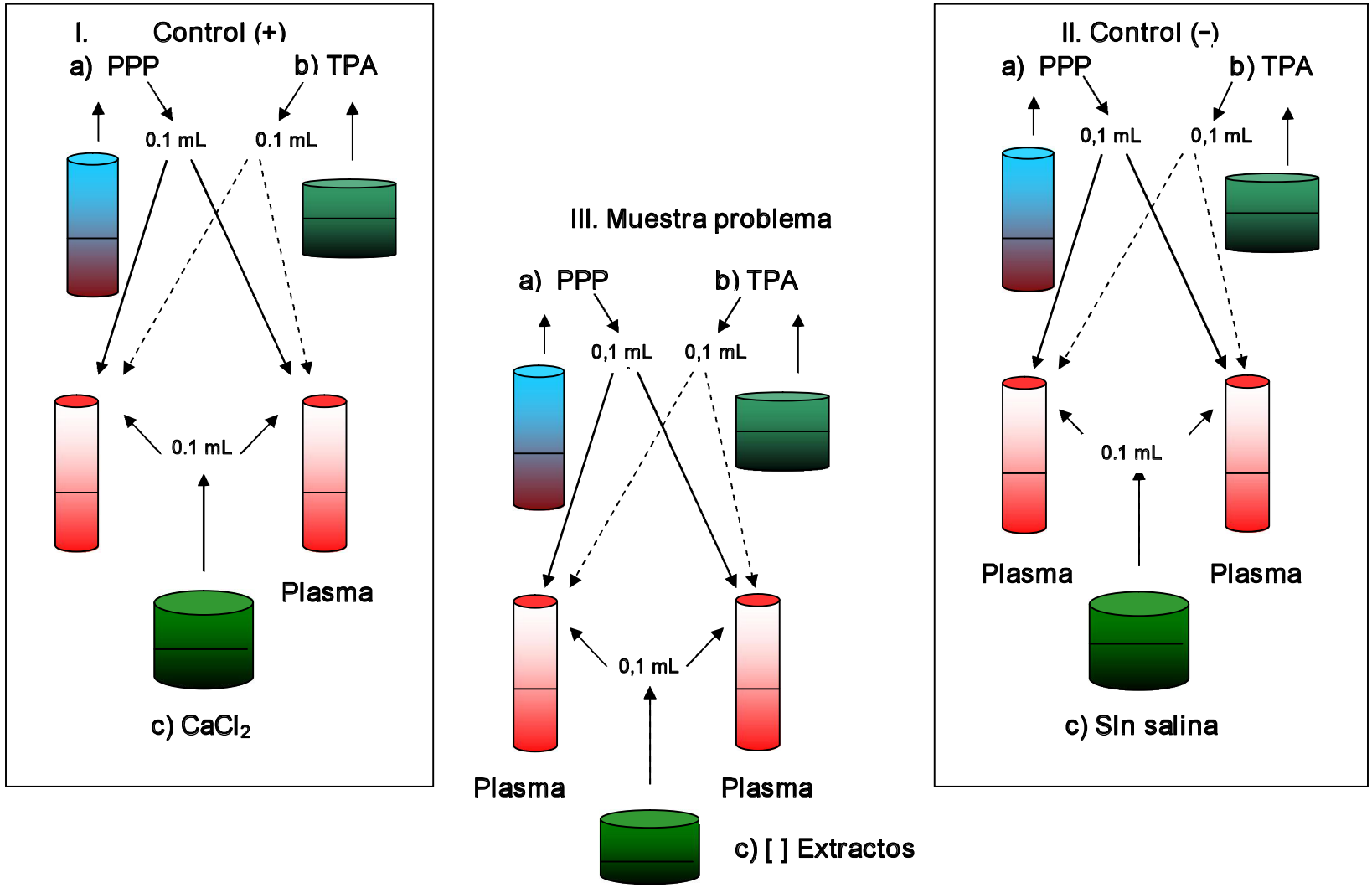
ANEXO 3. Resultado de la prueba Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada usando el **Et**, **F4** y **F5**.

Muestras	Concentración (mg/mL)	Valores obtenidos de la prueba biológica			Promedio de los pacientes			Desviación Estándar			Coeficiente de Variación		
					P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Extracto Total en Etanol (Et)	500	16.49 15.59	15.52 16.63	15.13 16.44	16.04	16.07	15.78	0.45	0.55	0.65	2.80	3.45	4.14
	250	29.76 32.11	29.32 32.31	31.38 33.11	30.93	30.81	32.24	1.17	1.49	0.86	3.78	4.85	2.66
	50	30.39 33.17	29.08 30.43	28.05 30.43	31.78	29.75	29.24	1.39	0.67	1.19	4.37	2.26	4.06
	10	32.11 30.88	30.35 28.77	29.30 30.36	31.49	29.56	29.83	0.61	0.79	0.53	1.95	2.67	1.77
	1	33.28 30.97	29.49 30.55	29.00 29.96	32.12	30.02	29.48	1.15	0.53	0.48	3.59	1.76	1.62
Fracción 4 (F4)	500	35.59 34.82	38.28 36.34	34.15 35.07	35.20	37.31	34.61	0.39	0.97	0.46	1.10	2.59	1.32
	250	40.22 42.01	43.91 44.03	39.36 41.01	41.11	43.97	40.18	0.89	0.06	0.82	2.16	0.13	2.04
	50	44.44 44.32	49.26 49.63	43.26 45.03	44.38	49.44	44.14	0.06	0.18	0.88	0.13	0.36	1.19
	10	51.33 49.47	56.89 54.96	53.55 53.61	50.4	55.92	53.58	0.93	0.97	0.03	1.84	1.73	0.05
	1	57.03 56.77	60.02 59.66	59.81 58.28	56.9	59.84	59.04	0.13	0.18	0.77	0.22	0.30	1.30
Fracción 5 (F5)	500	83 82	61 62	49 51.33	82.5	61.5	50.16	0.5	0.5	1.16	0.60	0.81	2.32
	250	65 63	46.27 47.33	49.77 51.23	64	46.8	50.5	1	0.53	0.73	1.56	1.13	1.44
	50	41.88 39.50	37.24 35.61	38.43 39.30	40.69	36.42	38.86	1.19	0.81	0.43	2.92	2.23	1.10
	10	35.42 37.52	30.88 32.79	34.31 32.15	36.47	31.83	33.23	1.05	0.95	1.08	2.87	2.98	3.25
	1	33.81 33.89	31.47 33.34	30.99 30.19	33.85	32.40	30.59	0.04	0.93	0.4	0.11	2.87	1.30

ANEXO 4. TTPA (reemplazando el reactivo de TPA por la concentración de los extractos vegetales).



ANEXO 5. TTPA (reemplazando el CaCl2 por la [ ] de los extractos vegetales).



ANEXO 6. Hoja de cálculo diseñada en Excel para realizar el análisis de Correlación y Regresión Lineal.

NUMERO DE DATOS= -

X	Y	X . Y	X^2	Y^2	Y_c

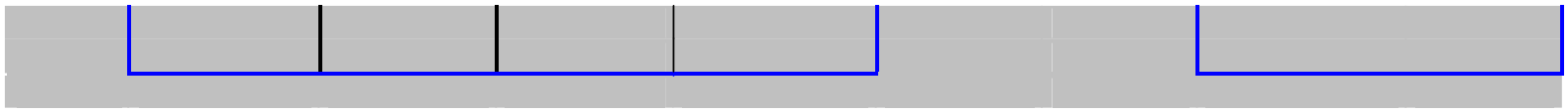
Σx	-	Σy	-	#¡DIV/0!
Σx^2	-	Σy^2		#¡DIV/0!
$(\Sigma x)^2$	-	$(\Sigma y)^2$	-	#¡DIV/0!
Σxy	-			

REGRESION		CORRELACION		
b_0	#¡DIV/0!	r =	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!
b_1	#¡DIV/0!	r^2 =	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

-2,00

ERROR ESTANDAR DE ESTIMACION		#¡DIV/0!
S_e	#¡DIV/0!	

ESTADISTICA DE PRUEBA t	
t	#¡DIV/0!

ANEXO 7. Hoja de cálculo diseñada en Excel para realizar el análisis de la Varianza (ANOVA).

No de datos	0		No de variables	0			
X	Y	Z	R	(X - x)2	(Y - x)2	(Z - x)2	(R - x)2
0	0	0	0			0,0	0,0
MEDIA X	MEDIA Y	MEDIA Z	MEDIA R		#¡DIV/0!		
				0			
DESVIACION	DESVIACION	DESVIACION	DESVIACION				
				0			
nS^2	Sp^2	F					
#¡VALOR!	#¡DIV/0!	#¡VALOR!