



PROTOCOLO PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LA SANGRE DE GRADO

I. Cabello, M. Shironoshita, O. Lock

*¹Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias,
Sección Química
Apartado 1761. Lima 100 - Perú.*

RESUMEN

Se realizaron los análisis de gravedad específica, cenizas, taninos, índice afrosimétrico, alcaloides totales, y el bioensayo de *Artemia salina* en 9 muestras de látex de sangre de grado colectados principalmente en Bagua, Iquitos y Tarapoto.

La presente investigación es una contribución al establecimiento de protocolos de calidad para drogas vegetales tan necesarios hoy en día en nuestro país

INTRODUCCION

Desde Antiguo se ha conocido el uso de plantas por sus propiedades medicinales, las que se han ido transmitiendo de generación en generación. Hoy en día su uso sigue siendo muy difundido, por ello es el interés en realizar estudios de los efectos terapéuticos, precisando, comparando y clasificando las diversas propiedades, conociendo los principios activos responsables de la actividad medicinal, determinando sus estructuras químicas, procurando sintetizar nuevos productos con mayor actividad, en beneficio de la Humanidad.

Por otro lado, se necesita conocer los principales requerimientos que califiquen a una planta como apta para ser utilizada sin daño alguno. El presente trabajo pretende dar un aporte en esta área, estableciendo un protocolo de calidad para la Sangre de Grado, una planta medicinal de uso común en el Perú.

En un protocolo de control de calidad para drogas vegetales se considera por lo general: la identificación botánica (nombre científico, nombre común, parte utilizada), la descripción de la droga (aspecto de la droga, forma, dimensiones, color, sabor, textura, tamaño de partícula), la valoración de principios activos, los ensayos fitoquímicos, los ensayos cromatográficos, la determinación de taninos, la determinación de aceites esenciales, el porcentaje de humedad y materia volátil, el porcentaje de cenizas totales y de cenizas insolubles en ácido, la determinación de metales pesados y de elementos extraños, los ensayos microbiológicos, etc.

ALGUNOS ASPECTOS DE LA SANGRE DE GRADO

La Sangre de Grado también conocida como Sangre de Drago, es un látex viscoso de color rojo oscuro obtenida del *Croton lechleri* (Muell.) Arg. (Euphorbiaceae) y de otras especies de Croton.

Es utilizada en la medicina popular en el tratamiento de úlceras gástricas duodenales, y de algunas enfermedades urogenitales femeninas, para afecciones de la boca y la garganta, diabetes, presión alta, para consolidar fracturas óseas, etc. También se ha reportado su uso como agente antitumoral y anticancerígeno, como antiinflamatorio y cicatrizante [1-6]. Estas dos últimas propiedades se atribuye en algunas referencias bibliográficas al alcaloide llamado taspina y en otras al lignano 3',4-O-dimetilcedrusin [2-4].

Además de la taspina se ha aislado el alcaloide sinoacutina [7]; dentro de los compuestos polifenólicos (>90% de peso seco) se han determinado proantocianidinas como el constituyente en mayor porcentaje, así como (+)catequina, (-)epicatequina, (+)gallo catequina, (-)epigalocatequina y procianidinas diméricas y triméricas: catequin - (4 α →8)-epigalocatequina, gallo catequin - (4 α →8)-epigalocatequina, gallo catequin - (4 α →8)-epicatequina, gallo catequin-(4 α →8)- gallo catequina y gallo catequin-(4 α →8)-gallo catequin-(4 α →6)-epigalocatequina [8].

Otros compuestos aislados son 1,3,5-trimetoxibenceno, 2,4,6-trimetoxifenol, 3,4-dimetoxifenol, sitosterol, sitosterol- β -D-glucopiranosido, β -sitosterona y varios diterpenos con esqueleto clerodano. Basado en los estudios cromatográficos y de resonancia magnética nuclear se ha concluido que la Sangre de Grado no contiene cantidades significantes de ésteres diterpénicos promotores de tumores [9].

Ultimos estudios sobre las actividades farmacológicas del látex Sangre de Grado, han demostrado su alta actividad antiviral debido a proantocianinas oligomérica, mientras que los monómeros respectivos son inactivos [10].

PARTE EXPERIMENTAL

Obtención del alcaloide taspina

Siguiendo la metodología general de extracción de alcaloides [11] se obtuvo 10 mg del alcaloide taspina el que fue utilizado como estándar. Los espectros UV, IR y RMN-¹H del alcaloide aislado coinciden con los reportados para la taspina [12].

Protocolo para el control de calidad de la Sangre de Grado

Material vegetal

Las muestras fueron proporcionadas como *Croton lechleri*, por diferentes proveedores y codificados como M₁ a M₆. Se nos informó que la procedencia de las muestras eran Tarapoto, Iquitos y Bagua, principalmente.

Análisis realizados

Para los análisis de gravedad específica, viscosidad y determinación de cenizas se utilizaron los métodos USP [13], la determinación de taninos según método AOAC [14], los bioensayos de *Artemia salina* según la Ref. [15] y el índice afrosimétrico según la Ref. [16].

Para la valoración de los alcaloides y los perfiles cromatográficos se siguieron métodos adaptados en nuestro laboratorio de la PUCP [17, 18].

Valoración de alcaloides totales [17]

2 g de látex seco, se acidifica con 30 mL de H₂SO₄ 2%; se basifica con NH₃ hasta pH 11 y se extrae con CH₂Cl₂, hasta reacción negativa al reactivo de Dragendorff.

Se lleva a 50 mL con CH₂Cl₂. Se toma una alícuota de 20 mL y se realiza la valoración en medio no acuoso, disolviendo la muestra en HOAc glacial y utilizando HClO₄/HOAc como agente titulante

y violeta cristal como indicador. El resultado se expresa como alcaloides totales referidos a taspina.

Perfiles cromatográficos [18]

Se realiza sobre el extracto metanólico según el siguiente procedimiento:

- Extracto metanólico: 0,5g de látex seco se extrae con 5 mL de MeOH durante 10 minutos con agitación constante. Se lleva nuevamente a 5 mL y se aplica 5 uL en la placa cromatográfica de sílica gel G_{254'} se eluye en el sistema AcOEt: MeOH: H₂O, 100:13,5:10 y se revela con vainillina/H₂SO₄.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se indican en la Tabla 1. A las muestras M₆ a M₃ sólo se les realizó la valoración de los alcaloides y los perfiles cromatográficos por ser en los momentos actuales los ensayos más requeridos para su comercialización.

1. En M₁, M₂, M₃ se observa que el contenido de sólidos totales (equivalente a muestra seca), gravedad específica, viscosidad y porcentaje de cenizas (a excepción de M₃) dan en promedio valores muy cercanos entre sí, lo que indicaría que habría poca variabilidad de estos parámetros en el látex Sangre de Grado.
2. M₄ que es un látex liofilizado muestra porcentaje de cenizas concordante con las muestras mencionadas en (1).
3. M₅ que es un látex adquirido en el mercado local muestra valores bajos en contenido de sólidos totales, gravedad específica y viscosidad, y un valor alto de porcentaje de cenizas (aproximadamente 4,5 veces las anteriores). Los resultados nos indican que el látex está muy diluido y que contiene probablemente alguna sustancia inorgánica que produce un aumento considerable de cenizas.
4. Respecto al porcentaje de taninos se observa que el contenido en M₁, M₂, M₃ y M₅ no presenta gran variabilidad, y es concordante

con la información que el porcentaje de compuestos polifenólicos es >90% [8]. Sin embargo M_4 presenta un valor más bajo.

5. De las muestras M_6 a M_9 , todas presentan un contenido de sólidos que puede ser considerado dentro de los valores encontrados de (1), con un valor ligeramente mayor en M_6 .
6. Con respecto a los alcaloides totales expresados como taspina se observó valores entre 1,64% y 3,24% para 8 de las muestras; teniendo la muestra M_6 un valor muy por debajo, de 0,236%, lo que consideraríamos anómalo.

Por otro lado la variabilidad de 1,64% a 3,24% confirmaría el hecho que la concentración de los productos naturales es dependiente del lugar y época de colección, de la edad de la planta, entre otros, por lo que es indispensable hacer estos análisis de valoración de principios activos para su prescripción médica, así como para la elaboración de los fitofármacos en las dosis adecuadas.

Algunos estudios [8] han reportado que la Sangre de Grado de Ecuador contiene sólo trazas de taspina mientras que las de Perú tienen un contenido mayor de 1%.

7. El índice afrosimétrico también da resultados variables que indicaría diferencias en la concentración de las saponinas, por las razones explicadas en (6).
8. Todos los látex analizados presentan muy buena actividad ante los ensayos de *Artemia salina*, existiendo muy buena correlación entre el porcentaje de alcaloides y la CL_{50} .
9. En el perfil cromatográfico del extracto metanólico de látex de sangre de grado se observa 4 manchas rojizas con valores de desplazamiento mayor que la rutina (Figura N° 1).

En la Figura N° 2 se observan perfiles cromatográficos comparativos de tres muestras de látex.



Figura 1: Perfil cromatográfico del extracto metanólico del látex de sangre de grado vs. rutina

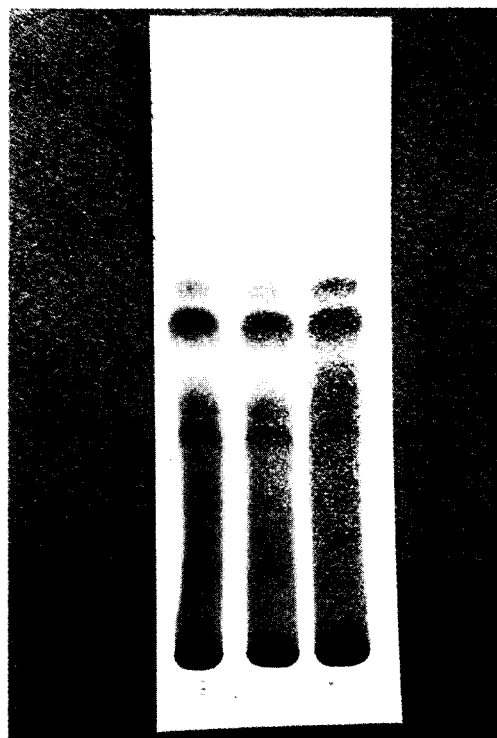


Figura 2: Perfiles cromatográficos comparativos de extratos metanólicos de tres látex de sangre de grado.

Tabla 1. Resultados de los análisis realizados sobre la muestra M_1 a M_9 , de Sangre de Grado

Muestras	Equivalente en muestra seca (g/mL látex)	Gravedad específica	Viscosidad (g/ms)	Porcentaje de cenizas	Porcentaje de taninos	Porcentaje de alcaloide expresado como taspina	IA	Artemia salina (ug/mL)
M_1	0,237±0,002	1,092±0,001	0,375±0,004	0,325±0,007	94,94±1,47	1,76±0,06	2670,94	19,4107
M_2	0,243±0,005	1,086±0,012	0,377±0,006	0,330±0,022	85,48±1,44	3,17±0,14	3011,69	14,2443
M_3	0,256±0,004	1,085±0,000	0,323±0,002	0,682±0,026	93,16±0,75	2,20±0,04	3833,19	18,2237
M_4	—	—	—	0,345±0,003	71,81±1,81	2,42±0,04	4095,70	15,0937
M_5	0,186±0,009	1,066±0,013	0,216±0,004	1,53±0,15	93,65±1,4	3,24±0,16	2498,15	9,4713
M_6	0,282±0,002					0,236±0,007		
M_7	0,251±0,004					2,67±0,09		
M_8	0,268±0,005					1,65±0,19		
M_9	0,239±0,005					1,79±0,10		

- Cada análisis se realizó por triplicado. Los resultados están expresados sobre muestra seca.
- Los intervalos de confianza han sido obtenidos aplicando la t-student, con un nivel de confianza de 95%.
- Procedencia de las muestras, Tarapoto (M_1 , M_5)
Iquitos (M_2 , M_3 , M_4)
Bagua (M_7)
No reportada (M_6 , M_8 , M_9)

CONCLUSIONES

Con las muestras analizadas se puede establecer los siguientes rangos para los látex de Sangre de Grado.

Ensayo	Rango
Equivalente en peso de muestra seca	0,237 - 0,282 g/mL
Gravedad específica	1,085 - 1,092
Viscosidad	0,323 - 0,377 g/ms
Porcentaje de cenizas	0,325 - 0,682 %
Porcentaje de taspina	1,65 - 3,24 %
Porcentaje de taninos	72 - 95 %
Indice afrosimétrico	2670 - 4015
Ensayo Artemia salina, LD ₅₀	14,24 - 19,41 µg/mL

BIBLIOGRAFIA

1. Barriga, R. (1994). **Plantas Utiles de la Amazonia Peruana: Características, Usos y Posibilidades**. Primera Edición, Editorial Libertad.
2. Pieters, L., Bruyne, T., Claeys, M., Vlientich, A. (1993). Isolation of a Dihydrobenzofuran Lignan from South American Dragon's Blood (*Croton spp*) as an Inhibitor of Cell Proliferation. *J. of Nat. Prod.* **56**, 899-906.
3. Nigg, H., Seigler, D., (1992). **Phytochemical Resources for Medicine in Agriculture**. Plenum Press, Nueva York y Londres.
4. Vaisberg, A.J., Milla, M., Planas, M., Córdova, J., Ross, E., Ferreyra, R., Mustiga, M., Carlín, L., Hammond, G. (1989). Taspine is the Cicatrizant Principle in Sangre de Grado Extracted from *Croton lechleri*, *Planta Médica*, **55**, 140-143.
5. Cai, Y. y col. (1994). Studies on the Anti-tumour, Anti-bacterial, and Wound Healing Properties of Dragon's Blood, *Planta Médica*, **60**, 541-545.
6. Gupta, M. (ed.). (1995). **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**, Programa CYTED, Colombia.

7. Carlín, L., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B. (1996). Isolation of Sinoacutine from the *Croton lechleri*, *Planta Médica*, **62**, 90-91.
8. Cai, Y., Evan F.J., Roberts, M.F., Phillipson, J.D., Lenk M.H. (1991). Polyphenolic Compounds from *Croton lechleri*, *Phytochemistry* **30**, 2033-2040.
9. Cai, Y., Chen, Z.P., Phillipson, J.D. (1994). Diterpenes from *Croton lechleri*, *Planta Médica*, **60**, 541-545.
10. Ubillas, R., et al (1994). SP-303 an Antiviral Oligomeric Proanthocyanidin from the Latex of *Croton lechleri*. *Phytomedicine*, **1**, 77-106.
11. Lock, O. (1994). Investigación **Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales**. Fondo Editorial PUCP, Lima.
12. Talapatra, B., Chandhuri, P., Talapatra, S. (1982). Maglifloenol, a Novel Spirocyclohexadienone Neolignan and other Constituents from *Magnolia liliflora*. *Phytochemistry*, **21**, 747-750.
13. United States Pharmacopeia, USP (1980) 20th edition, E.U.A., p. 776-779.
14. AOAC (1980), 4th ed. Método 30.018, p. 498.
15. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Pitman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.R., Laughlin, J.L. (1982). Brine Shrimp-A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Médica* **45**, 31.
16. Archivo Servicios a Terceros, PUCP (1993). LOPUC 1, LOPUC 2.
17. Archivo Servicios a Terceros, PUCP (1998). LOPUC 4.
18. Archivo Servicios a Terceros, PUCP (1998). LOPUC 5.