

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA PLANTA *CISSUS SICYOIDES*.

Ma. Martha Sandoval Arreola
Mar y Sol Blas Jiménez
Edith Díaz Martínez
Victoria Belen Rosales Machado

RESUMEN

La presente investigación se realiza con la finalidad de evaluar la actividad hipoglucemiante de la planta *Cissus Sicyodes* en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Se exponen los resultados preliminares de la identificación fisicoquímica de los metabolitos secundarios presentes en la planta cultivada en la región costera de Lázaro Cárdenas. La metodología seguida para la determinación cualitativa de flavonoides y esteroides son las técnicas de Shinoda y Libermann-Burchard, respectivamente, que forman parte del método de Wall y colaboradores. Para la determinación de Saponinas se usó el método de Cain. Los resultados obtenidos en el *allium test* comprueban que la planta no tiene efectos tóxicos sobre la reproducción celular. Las pruebas cualitativas de flavonoides, cumarinas, saponinas y esteroides resultaron positivas, lo que indica la presencia de uno a varios compuestos pertenecientes a estas familias. Estos resultados abren la posibilidad de la continuación de la investigación para evaluar su posible actividad hipoglucemiante.

Palabras clave: *Cissus Sicyoides*, Flavonoides, Esteroides, Saponinas, hipoglucemiante.

INTRODUCCIÓN

La planta *Cissus Sicyoides* se utiliza en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en la medicina tradicional. Popularmente es conocida como tripa de vaca, bejuco, cortina del cielo (Argentina), uvilla de culebra (Perú), uva loca ó insulina vegetal. Es una planta perenne, trepadora o rastrera, con zarcillos, leñosa, que alcanza hasta los 10 m; las hojas son de color verde brillante, grandes, de 3 a 15 cm de largo por 2 a 13 cm de ancho, con forma oblonga o acorazonada. La medicina tradicional le atribuye diversas propiedades: la savia de los tallos se usa como remedio para las hemorroides y el reumatismo, como bebida diaria contra el gonococo y como antibacteriano en las dermatosis, afecciones respiratorias, y digestivas. Infusiones calientes de tallos y hojas se utilizan como remedio para aliviar la gripe e inflamación muscular en la epilepsia. En el tratamiento de la diabetes ha sido ampliamente usada, de ahí en nombre de insulina verde o insulina vegetal. Se han realizado varios estudios farmacológicos usando ratas normales y diabéticas para valorar los efectos hipoglucemiantes de las infusiones, encontrando efectos positivos en el control de la reducción de la glucemia y triglicéridos (De Sousa, 2007), (Lefebvre, 2011); (Vessal *et al*, 2003); Braga (2008), reporta resultados positivos en la reducción de la glucemia en un 35% con dosis de 4.5 mg / kg y con dosis de 13.5 mg/kg la reducción fue de 60% en un periodo de 28 días. Sin embargo también existen estudios de casos clínicos sobre un grupo de pacientes voluntarios y en ratas donde se reportan resultados negativos sobre la actividad hipoglucemiante de la planta, (Beltrame *et al*. 2001; Hosana *et al*. 2009).

La presencia de metabolitos secundarios en las hojas también ha sido objeto de estudio desde hace tiempo. Weniger *et al.* (1984), encontraron como componentes de las hojas a los terpenoides, esteroides, quinonas y compuestos fenólicos. De igual manera, Scull *et al.* (2000), demostraron la presencia de taninos, compuestos reductores, triterpenos esteroides, aminoácidos, compuestos grasos y flavonoides en las hojas. En estudios más recientes, Braga, (2008), cuantificó los compuestos fenólicos totales por técnicas cromatográficas reportando valores de 381.0, 52.0 y 2574.0 mg/ml en equivalente de ácido tánico, dependiendo de la técnica de detección usada. Beltrame *et al.* (2002), identificaron mediante análisis espectrales las cumarinas: 5,6,7,8-tetrahydroxycoumarina 5β-xilopiranosido, y sabandin, dos flavonoides: kaempferol-3 ramnósido y quercetina 3-O ramnósido,, además de dos esteroides: sitosterol y 3beta-O-beta-D-glucopyranosylsitosterol. Es en este contexto, que en esta investigación se busca contribuir al estudio de la planta *Cissus Sicyoides* y sus efectos como un agente antidiabético presentando los resultados preliminares de dicho estudio.

JUSTIFICACIÓN

Según datos reportados por el INEGI, en 2014 la población total de Michoacán fue de 4 millones 300 mil habitantes en el año 2014, reportando 24 mil 840 defunciones en ese año. Las causas principales de las defunciones fueron enfermedades cardiacas, diabetes Mellitus y tumores malignos. Ante estas estadísticas surge este proyecto en la búsqueda de soluciones alternativas en la medicina tradicional que resulten menos costosa que los tratamientos actuales de los que se sabe que pueden causar efectos secundarios como cansancio, mareos, problemas respiratorios entre otros.

METODOLOGÍA

Preparación de la planta:

Las hojas de la planta fueron cortadas, lavadas y secadas en un horno marca "Felisa"® a una temperatura de 100°C por 8 horas, G. Lefebvre, (2011). Después se trituró hasta obtener un polvo fino tamizado en mallas número 16, 50 y 200.

Identificación de Flavonoides:

Se llevó a cabo usando el método modificado de Wall, (J. Alarcón, 2012). 20 g de planta pulverizada fueron puestos durante una hora en baño maría con 100 mL de etanol al 95%. Se dejó enfriar para continuar con el filtrado. El material fue lavado con 4 volúmenes de 50 mL de etanol al 95%. El filtrado y las soluciones limpiadoras se juntaron para evaporarse a 50 °C y a presión reducida hasta 50 mL. Este concentrado se aforó a 100 mL. con agua. Después, la solución se dividió en dos porciones, una para flavonoides y otra para esteroides. La primera prueba realizada fue la de Shinoda (J. Alarcón, 2012), para determinar la presencia de flavonoides, en un tubo de ensayo al filtrado se le agregó un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de HCl concentrado. La obtención de un color rojo o violeta indica la presencia de flavonoides.

Identificación de Esteroides:

Se siguió la técnica de Libermann-Burchard (Rossi, 2007). Se mezcló 1 mL. de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrió la mezcla a 0°C y se añadió una gota de H₂SO₄. La solución preparada se mezcla con el extracto de la planta. Un cambio de coloración a azul, verde, rojo, o amarillo en función del tiempo indica que la prueba es positiva (J. Alarcón, 2012).

Identificación de Saponinas:

Se utiliza el método de Caín descrito por (Pérez, (2006). Se colocaron 5 g de muestra en un cartucho del equipo soxhlet, usando metanol como solvente. Se realizó la extracción hasta obtener una coloración rojo-café rojiza en el solvente. Una porción del solvente se disolvió en H₂O caliente (en un tubo de ensayo) durante 15-30 minutos en baño maría, agitando vigorosamente durante 3-5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abejas, estable por unos 30 minutos indica prueba positiva.

Identificación de cumarinas:

Obtención del extracto: se pesaron 5 g de material vegetal fresco, se maceró en un mortero hidratando la muestra para facilitar el rompimiento de los tejidos, se pasó la muestra completamente macerada a un vaso de precipitados y se le adicionó agua hasta cubrir completamente la muestra calentando a en baño maría durante 10 minutos y filtrando en caliente. Para la identificación de cumarinas se tomó 1 mL. del filtrado en un tubo de ensayo y se adicionaron 2 gotas de solución de tricloruro férrico al uno por ciento. La aparición de un color verde, azul o negro indica prueba positiva para compuestos fenólicos.

Determinación del grado de toxicidad de la planta mediante el Allium Test.

Se siguió la metodología propuesta por Díaz *et al.* (2004). Bulbos de cebolla blanca (*Allium cepa* L.), de 1.5 cm de diámetro, secos y sin hojas o raíz, fueron limpiados con un bisturí para eliminar las raíces del área radicular y eliminar la epidermis seca. Los bulbos limpios se colocaron en agua destilada por 2 horas para eliminar restos de tejidos y se dejarán secar. Se utilizaron 4 réplicas por concentración y un control con agua destilada. Se empleó el método de dilución en forma secuencial usando como solución madre 100 g de muestra fresca molida en 100 mL de agua destilada. De la solución madre se tomaron 50 mL. y se diluyeron con 50 mL. de agua para obtener la segunda solución y así hasta obtener 4 diluciones. Se usaron pequeños recipientes en donde se les colocó 20 mL de solución hasta el borde y se colocaron los bulbos dejando la zona radicular inmersa en el líquido. Se dejaron durante 5 días evitando la luz directa. Se utilizó una pipeta Pasteur para reponer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para finalizar se registró la longitud promedio de las raíces. El efecto de la solución en el crecimiento de las raíces se efectuó por comparación en el crecimiento de los bulbos de cebolla en las diferentes diluciones (Díaz, 2004).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios de la planta *Cissus Sicyoides* se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Resultados de las diferentes pruebas

Prueba	Resultados
Flavonoides	Positivo
Cumarinas	Positivo
Esteroles	Positivo
Saponinas	Positivo
Allium test	Negativo

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se muestran los cambios obtenidos en las diferentes soluciones que nos indican la presencia de las familias estudiadas.



Figura 1. Identificación positiva de flavonoides. Cambio de coloración a naranja



Figura 2. Identificación de Esteroles,



Figura 3. Identificación de saponinas

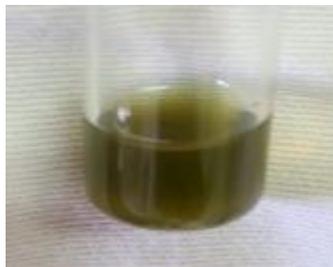


Figura 4. Identificación de cumarinas

La identificación cualitativa de las diferentes familias que están presentes en las hojas de *Cissus Sicyoides* permite analizar los efectos positivos y negativos que se tendrían por consumo de la planta.

La presencia de cumarinas (fenilpropanoides) se confirmó mediante el cambio de coloración, coincidiendo con lo reportado por Braga, (2008), por lo que resulta de interés evaluar el tipo y la concentración de ellas en las infusiones para consumo humano pues es conocido que algunos de los derivados de la cumarinas tienen propiedades anticoagulantes (dicumarol o 4- hidroxycumarina) García, (2013). En dosis elevadas puede tener efectos hemorrágicos. Las cumarinas que han sido identificadas en otras investigaciones son 5, 6, 7,8-tetrahydroxycumarina 5 β -xilopiranósido, y sabandin.

La identificación positiva de flavonoides en la planta *Cissus Sicyoides* resulta prometedora respecto a su uso con efectos hipoglucemiantes, la coloración obtenida fue un color naranja, similar al obtenido por Alarcón (2012).

Los posibles flavonoides presentes en la planta *Cissus Sicyoides* son: kaempferol-3 ramnósido y quercetina 3-O ramnósido, este último, está siendo objeto de una gran variedad de estudios biológicos y farmacológicos sobre su acción en la producción de insulina y como antioxidante. Vessal et al. (2003). Torres-Piedra et al. (2010) describen a la quercetina como un potencial agente antidiabético mediante la inhibición de la enzima deshidrogenasa tipo 1 (11 β -hidroxiesteroide) la cual es estimuladora de la acción de la hormona glucocorticoide, antagonista de la insulina. De la misma forma Vessal et al. (2003) informó que la quercetina es estimuladora de la enzima glucoquinasa hepática.

La presencia de esteroides resultó positiva, lo que debe estar relacionado con la afirmación de varios investigadores que han dicho que el consumo de 1 y 3 g/día de fitoesteroides reduce la concentración de colesterol (LDL, colesterol malo) y los triglicéridos (Braga, 2008). Quien encontró que la dosis de 13.5 mg / kg redujo los niveles de triglicéridos en un 70%.

La identificación de saponinas resultó positiva, la coloración del residuo fue rojo-café, al agitarlo se formó espuma con apariencia de panal de abejas, similar al obtenido Pérez (2006). Este resultado nos indica la necesidad de profundizar en el estudio de este grupo, para identificar el tipo de saponina presente, debido a que las plantas que contiene saponinas sobre todo las llamadas saponinas, que presentan actividad hemolítica sobre los glóbulos rojos sanguíneos.

En la figura 5 se presentan los resultados del ensayo de toxicidad realizado con bulbos de cebolla *Allium Cepa L* mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces. Puede observarse el descenso del crecimiento de las raíces a medida que la concentración baja.

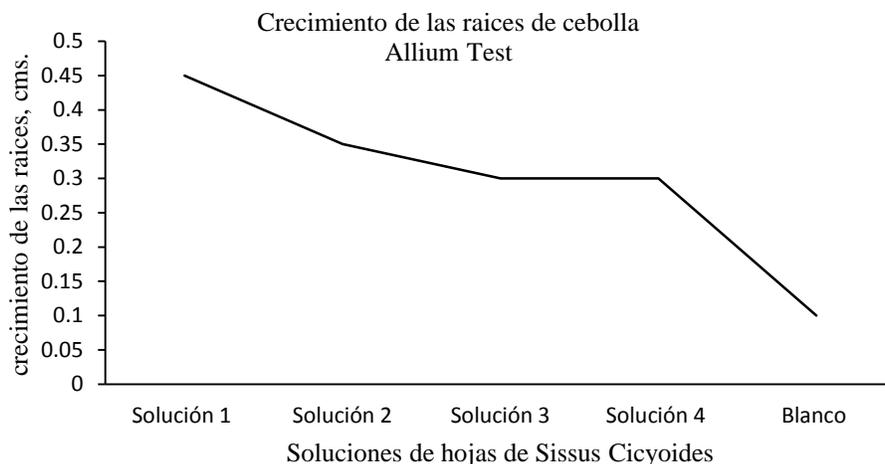


Figura 5 : Prueba de toxicidad. Allium Test. Las pruebas se hicieron por cuadruplicado.

Las figuras 6, 7 y 8 muestran los bulbos antes de someterlos al tratamiento en soluciones de la planta *Cissus*, mientras las figuras 9, 10 y 11 muestran los mismos bulbos después de 5 días de tratamiento con las soluciones 3, 4 y el blanco.



Figura 6. Bulbo de cebolla antes del tratamiento en la solución 3



Figura 7. Bulbo de cebolla antes del tratamiento en la solución 4



Figura 8. Bulbo de cebolla antes del tratamiento en el blanco



Figura 9.
Crecimiento de las raíces después de 5 días de tratamiento con la solución 3



Figura 10. Crecimiento de las raíces después de 5 días de tratamiento con la solución 4



Figura 11. Crecimiento de las raíces después de 5 días de tratamiento con la solución blanco.

El resultado obtenido en el estudio de la toxicidad de la planta a través del allium test, indica que en las concentraciones utilizadas no se inhibe del crecimiento promedio de raíces por el contrario, en concentraciones altas fue donde mayor crecimiento se tuvo por lo que se concluye que en esas concentraciones, no se presenta actividad citotóxica que afecte el desarrollo de las células de la reproducción de los bulbos, resultados que coinciden con los reportados Lefebvre, (2011), en un estudio similar.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La identificación cualitativa de las diferentes familias que están presentes en las hojas de *Cissus Sicyoides* permite analizar los efectos positivos y negativos que se tendrían por consumo de las infusiones hechas con hojas de la planta. Cualitativamente las pruebas de los cuatro grupos de metabolitos resultaron positivas. Los metabolitos de mayor importancia para el estudio de sus efectos hipoglucemiantes son los flavonoides y los esteroides.

El resultado obtenido en el estudio de la toxicidad de la planta a través del allium test, indica que con las concentraciones utilizadas no se afecta el crecimiento de las raíces de la planta por el contrario, en concentraciones altas fue donde mayor crecimiento se tuvo por lo que se concluye que en esas concentraciones, no se presenta actividad citotóxica que afecte el desarrollo de las células de la reproducción de los bulbos.

Los resultados obtenidos en este proyecto resultan promisorios para la continuidad de la investigación. La identificación positiva de flavonoides y esteroides en la planta *Cissus Sicyoides* resulta prometedora respecto a su uso con efectos hipoglucemiantes.

BIBLIOGRAFÍA

Alarcón J., Navarro C. (2012). Determinación de la presencia de algunos compuestos químicos por métodos fitoquímicos colorimétricos en cinco especies forrajeras. Revista de Sistemas de Productos Agroecológicos, vol. 3:1. Recuperado de <http://www.sistemasagroecologicos.co/art4/pag5.pdf>

Bandeira S. H. (2009). Clinical trials with the leaves of *Cissus sicyoides* L. (vitaceae) in glucose-intolerant and in type 2 diabetic patients. . RBAC, vol. 41(1): 35-42, 2009

Bandeira S.H., Modesto F.J., Formiga Melo Diniz M.F, Cavalcanti de V. T.H., de Brito P. F.S., Ramalho J.A., Jadson Gomes D.J.E, (2008). Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cissus sicyoides* in phase II clinical trials. Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 18 No. 1. ISSN 0102-695X

- Beltrame, F.L., Sartoretto, J.L., Bazotte, R. B., Cuman, R. N., Cortez, D., Aparício García, Fernandes, L. Claudio, & Tchaikovski, O. (2001). Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Química Nova*, 24(6), 783-785. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000600014>
- Beltrame FL, Ferreira AG, Cortez DA. (2002). Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. *Nat Prod Lett.* Aug; 16(4):213-6. PMID: 12168753 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Braga V. T (2008). Evaluación de la actividad farmacológica de *Cissus verticillata*. y Nicolson C. E. Antioxidante, antifúngico, hipoglucemiante. Asesor: Jorge Tanus Nagem. Co-asesor: Tania Toledo de Oliveira. Thesis.
- De Sousa L. C., de Paiva S. T., Bezerra G. P., Falcão do A. J., Oliveira A. F. S., Silveira E. R, Ferreira J. M., de Sousa, Rodríguez D. F., de Q. M. G., Florenço de S. F. C., de Castro B. G. A., Da Rocha C. B. S. M. and de Barros V. G.S. (2007). Anti-Diabetic Activity of a Fraction from *Cissus verticillata* and Tyramine, its Main Bioactive Constituent, in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2 (4):178-188, 2007 ISSN 1557-4962 © Science Publications
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res.* 2004; 51(2):117-123.
- González-Sánchez A., Cabañas-Wuan Á., Arana-Argáez V., Hernández-Núñez E., Ortiz-Andrade R. (2011). Citroflavonoides como posible alternativa en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* vol. 42 no.3 México.
- Díaz B. M. C., Ronco A., Pica G. Y. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium Cepa* L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces. *Revista Intercalibrados*. Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap2.pdf>
- García J.P (2013). Nuevos anticoagulantes frente a anticoagulantes clásicos: ventajas e inconvenientes. *Semergen.* V.39 (Supl 1):10-16
- Lefebvre, G. (2011). Novo Hamburgo - RS (Ou *Cissus sicyoides* – Una alternativa para la diabetes mellitus tipo 2. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=V8nOBkDATC8>.
- Pérez L. E. (2006) Estudio fitoquímico biodirigido de las plantas con potencial actividad insecticida *trichiliahavanensis* y *crotonciliatoglanduliferus*. Tesis de pregrado. Puebla, México. 70 p.
- Pineda M. (1989). Hacia una farmacopea caribeña. Honduras. Editorial Enda-Caribe, U.A.G/U. Antioquía. Colombia. ; 4:105-6.
- Rossi, C. A., De León, M., Gonzales, L. y Pereyra, A. M. (2007). Presencia de metabolitos secundarios en el follaje de 10 leñosas de ramoneo en el bosque xerofítico del CahcoArido argentino. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 7: 002: 133 -143. 2007.
- Scull L., Miranda M. M. y Caballero P. O. (2000). Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejuco-ubí). *Rev. Cubana Farm.* Vol. 34 (2): 120-4 pp. 120-124. Instituto de Farmacia y alimentos. Universidad de la Habana. ISSN 1561-2988 Recuperado en 14 de junio de 2016, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000200006&lng=es&tlng=es.
- Torres-Piedra M, Ortiz-Andrade RR, Villalobos-Molina R, Singh N, Medina-Franco J, Webster S, Binnie M, Navarrete-Vázquez G, Estrada-Soto S. A comparative study of flavonoid analogues on Streptozotocin/Nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(6):2606-2612
- Weniger B, Sabary H, Saturny A. (1984). Tri-phytochimique de 4 plantes de la liste TRAMIL. Haiti (1984): Editorial Enda-Caribe, U.A.G/U. Antioquía. Colombia. 175.