

# ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y TOXICOLÓGICA DE LAS SAPONINAS DE *Colletia spinosissima* Gmelin "Tacsana". AYACUCHO, 2018

Raúl Mamani Aycachi

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Biológicas  
Programa de Investigación en Biodiversidad y Gestión Ambiental, Sub Programa de Gestión Ambiental  
E\_mail: profmamani@hotmail.com

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como **Objetivo**; determinar la actividad hemolítica y toxicológica de las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" así como el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico. Por información etnobotánica se conocía que desde tiempos remotos nuestros antepasados la utilizaban como insumos para la limpieza. **Materiales y métodos**; Como material biológico se utilizó la raíz de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" de lo cual extrajo las saponinas que luego sirvieron para determinar su actividad toxicológica, hemolítica y tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico. **Resultados**; Se comprobó la actividad toxicológica mediante la determinación de  $CL_{50}$  por actividad biocida de las saponinas a diferentes concentraciones, siendo la concentración letal media = 519,418543 ppm. El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", indica la abundante cantidad de saponinas, esteroides y en regular cantidad azúcares reductores, por otro lado, en referencia a la actividad hemolítica de las saponinas a concentraciones determinadas no presentaron hemólisis de los glóbulos rojos humanos. **Conclusiones**; Las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", constituye una fuente de investigación a continuar por el enorme potencial con el que cuenta debido a su actividad biocida, y medicinal.

Palabras clave: Actividad toxicológica, hemolítica y tamizaje fitoquímico.

## HEMOLYTIC AND TOXICOLOGICAL ACTIVITY OF THE SAPONINS OF *Colletia spinosissima* Gmelin "Tacsana". AYACUCHO, 2018

### ABSTRACT

The present investigation had as **objective**; determine hemolytic and toxicological activity of the saponins of *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" as well as the phytochemical screening of the hydroalcoholic extract. By ethnobotanical information it was known that since ancient times our ancestors used it as cleaning supplies. **Materials and methods**; The root of *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" was used as biological material, from which it extracted the saponins that were then used to determine its toxicological, hemolytic and phytochemical screening activity of the hydroalcoholic extract. **Results**; the toxicological activity was checked by determining  $LC_{50}$  by biocidal activity of the saponins at different concentrations, the mean lethal concentration = 519.418543 ppm. The phytochemical screening of the hydroalcoholic extract of the root of *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", indicates the abundant amount of saponins, steroids and in regular amount reducing sugars, on the other hand, in reference to the hemolytic activity of the saponins at certain concentrations they did not present hemolysis of human red blood cells. **Conclusions**; The saponins of *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", constitutes a source of research to continue because of the enormous potential it has due to its biocidal activity, and medicinal.

Key words: Toxicological activity, hemolytic and phytochemical screening.

### INTRODUCCIÓN

Las saponinas se clasificaron antiguamente como algunos de los glucósidos vegetales que forman una espuma jabonosa cuando se mezclan y se agitan con agua, por lo que se han utilizado de forma rutinaria como detergente, espumante y emulsificantes. Se ha demostrado por medio de estudios anteriores que estos surfactantes naturales contienen glucósidos de esteroides y triterpenos, que existen ampliamente en las plantas terrestres, alimentos importantes y especialmente en las plantas medicinales. Hasta ahora, miles de saponinas homogéneas han sido aisladas y caracterizadas. Estos glucósidos muestran una gran diversidad estructural y un amplio espectro de actividad biológica, siendo la hemólisis probablemente la actividad

común entre muchas saponinas estructuralmente diferentes. (Hasewaga & Miyamoto 1998).

La propiedad hemolítica de las saponinas ha sido el fundamento determinante en el desarrollo de diferentes potenciales terapéuticos, ya que amedrenta el uso de abundantes productos naturales; sin embargo, la relación de la lisis con otras actividades biológicas como la antitumoral, adyuvante y antiinflamatoria ha tenido buenos resultados sobre las membranas celulares. (Hernández & Hermosilla 2014).

Las saponinas se clasificaron antiguamente como algunos de los glucósidos vegetales que forman una espuma jabonosa cuando se mezclan y se agitan con agua, por lo que se han

utilizado de forma rutinaria como detergente, espumante y emulsificantes. Se ha demostrado por medio de estudios anteriores que estos surfactantes naturales contienen glucósidos de esteroides y triterpenos, que existen ampliamente en las plantas terrestres, alimentos importantes y especialmente en las plantas medicinales. Hasta ahora, miles de saponinas homogéneas han sido aisladas y caracterizadas. (Hernández & Hermosilla 2014) En este trabajo de investigación, los objetivos fueron los siguientes:

### Objetivo General

Determinar la actividad hemolítica y toxicológica de las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

### Objetivos específicos

- Evaluar la actividad toxicológica de las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” mediante la concentración letal media sobre *Daphnia sp* “pulgas de agua”.
- Especificar las características fitoquímicas de extracto hidroalcohólico de raíces de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.
- Estimar la actividad hemolítica de las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” sobre glóbulos rojos (GR) humanos O+.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Ubicación de la zona de estudio

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Bioquímica del Área de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de enero a diciembre del 2018.

### 2. Población y muestra

#### 2.1. Población

Los materiales biológicos fueron colectados en las zonas aledañas a la ciudad de Ayacucho, del distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región de Ayacucho a 2760 m.s.n.m.

#### 2.2. Muestra

Las muestras recolectadas en aproximadamente 10 kg de plantas frescas, en buen estado, transportadas en bolsas de papel para evitar su descomposición.

### 3. Métodos

#### a. Preparación de material biológico

El material biológico es lavado cuidadosamente con agua corriente en el laboratorio, luego retiradas las hojas sanas y completas, pesado en fresco y secadas a la sombra, proceso de 30 días.

Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas para tamizaje fitoquímico.

Se pesó 100 gr de hojas secas de cada muestra, luego se trituraron con un mortero, pesadas 10 gr y depositadas en frascos ámbar, luego se agregó 50 ml de alcohol al 80%, durante una semana con agitación diaria por 20 minutos.

Luego se filtra y se obtiene el extracto hidroalcohólico, de los cuales se elimina los residuos de alcohol por

evaporación utilizando baño maría con agitación a 60 °C. Las muestras son colectadas y preservadas en recipientes de color ámbar, hasta su utilización a T° de 4°C.

#### b. Extracción Soxhlet

Consiste en un método de extracción sólido- líquido, que se utiliza generalmente para aislar los componentes lipídicos de una muestra por medio de un solvente. Se pesan 10 gr. de la muestra de hojas, se coloca en equipo soxhlet utilizando como solvente etanol de 96°, y se somete al calor mediante una cocinilla y con reflujo de agua, se obtiene el extracto que constituye la muestra para tamizaje fitoquímico.

#### c. Ensayo de espuma

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, en una probeta por 15 segundos, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar una solución acuosa de un jabón. Esta es una prueba presuntiva de saponinas, ya que existen otras sustancias que también pueden formar espuma. (Hernández & Lugo 2005).

#### d. Ensayo de hemólisis

Para la determinación de saponinas en plantas de uso medicinal una de las pruebas que se realizan es la de hemólisis, ésta puede llevarse a cabo de dos maneras: mediante ensayos en tubo en los cuales se utilizan eritrocitos humanos lavados y mantenidos en suspensión con amortiguador glicina-NaCl (glicina 0.1M en cloruro de sodio al 0.6%) a pH 5.8. La actividad hemolítica de los extractos puede ser evaluada en tubo y en placa por métodos directos e indirectos. (Martínez & et al 2008).

#### 4. Evaluación de la toxicidad

La toxicidad de los agentes tóxicos en un organismo acuático, se expresa usualmente en términos de dosis letal media (CL<sub>50</sub>); este valor representa la cantidad de toxico por unidad de peso que mata 50% de los animales empleados en la prueba. La dosis letal media se expresa en mg Kg-1 y ocasionalmente en mg por animal. (Castro & et al 1998).

#### 5. Caracterización Fitoquímica

La metodología utilizada para la marcha fitoquímica fue la propuesta por la Dra. Migdalia Miranda Martínez- Cuba. El método que se utilizó para el tamizaje de las muestras fue el descrito por la Dra. Migdalia Miranda Martínez en el Manual de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Universidad de la Habana Cuba (Miranda & Cuellar 2000).

Se realizaron ensayos en los que se evaluó la formación de precipitado y complejos coloreados, para evaluar la presencia de saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, aminos, coumarinas, quinonas, alcaloides, triterpenos, esteroides y flavonoides.

#### 6. Análisis estadístico - probits

Describe un programa en lenguaje BASIC, para plataforma MSDOS, diseñado para calcular la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>) de agentes tóxicos utilizando el método de transformación en probits. Para la utilización del programa, el operador provee las dosis del agente tóxico empleado en el ensayo de toxicidad aguda

letal, el número de animales utilizados en cada dosis, y el número de animales que murieron con dicha dosis; la  $CL_{50}$ , así como los límites fiduciales al 95% de confianza. Asimismo, se presentan los valores definitivos y provisionales de la recta. El programa ofrece además la

posibilidad de efectuar reanálisis de los datos en los casos en que se desee buscar mayor aproximación de los valores; gráfica, archivo de resultados en disco, y la opción de comparación de dos curvas, para la estimación de potencias relativas. (Martínez & et al 2010).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 1.** Mortalidad de *Daphnia* sp. “pulgas de agua” por aplicación de diferentes concentraciones de saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

| Concentración (ppm) | Número de individuos muertos |           |           | Promedio |
|---------------------|------------------------------|-----------|-----------|----------|
|                     | Muestra 1                    | Muestra 2 | Muestra 3 |          |
| 100                 | 0                            | 1         | 1         | 1        |
| 300                 | 2                            | 4         | 3         | 3        |
| 500                 | 4                            | 5         | 4         | 4        |
| 800                 | 6                            | 6         | 5         | 6        |
| 1000                | 6                            | 7         | 7         | 7        |
| 1200                | 10                           | 9         | 8         | 9        |

**Análisis e interpretación:** A medida que se incrementa la concentración de saponina se va incrementado el número de individuos muertos.

**Tabla 2.** Límite superior, límite inferior y concentración letal de mortalidad de *Daphnia* sp “pulgas de agua” a diferentes porcentajes de saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

| Porcentaje % | Límite Inferior | Límite Superior | CLn (ppm)  |
|--------------|-----------------|-----------------|------------|
| 10           | 3,12023         | 5,45324         | 128,613271 |
| 20           | 4,10056         | 5,80451         | 207,680325 |
| 30           | 4,7828          | 6,08244         | 293,395052 |
| 40           | 5,32783         | 6,35783         | 394,161215 |
| 50           | 5,77489         | 6,67762         | 519,418543 |
| 60           | 6,13571         | 7,08363         | 684,487238 |
| 70           | 6,43828         | 7,60149         | 919,573522 |
| 80           | 6,73118         | 8,26876         | 1299,1039  |
| 90           | 7,09086         | 9,24068         | 2097,7487  |
| 99           | 7,87838         | 11,6156         | 6546,19995 |

**Análisis e interpretación:** Valores porcentuales de concentración de saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana” con su respectiva concentración letal y límites superiores e inferiores.

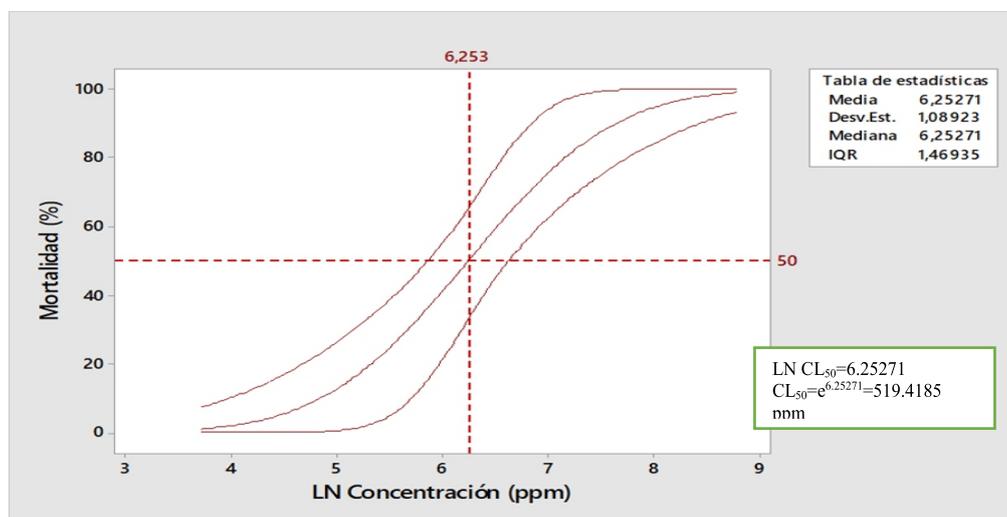


Figura 1. Análisis Probits de mortalidad de *Daphnia* sp “pulgas de agua” por aplicación de diferentes concentraciones de saponina de *Colletia spinosissima* Gmelin “tacsana”.

### Análisis e interpretación

De la figura podemos manifestar que la  $CL_{50}$  es 519.4185 ppm, siendo este un valor cercano a la media que reporta 6.25271. Pino (2015) reporta concentración letal sobre larvas en estadio III de *Culex quinquefasciatus* "zancudo". La  $CL_{50}$  = 14,97 g/L



Figura 2. Muestra de extracto hidroalcohólico de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana". Sometida a Rota evaporador para eliminar residuos de alcohol.

**Tabla 3.** Tamizaje fitoquímico de principios bioactivos de extracto hidroalcohólico de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana". Ayacucho, 2018.

| Metabolito  | Prueba fitoquímica | Extracto etanólico |
|-------------|--------------------|--------------------|
| Saponinas   | Espuma             | ++++               |
| Esteroides  | Liberman- Burchard | ++++               |
| Taninos     | Gelatina           | +                  |
| Flavonoides | Shinoda            | +                  |
| Glicósidos  | Molish             | +++                |
| Quinonas    | Bortranger         | ---                |

Leyenda:

(--) Ausencia

(+) Poca cantidad

(++) Regular cantidad

(++++) Abundante cantidad

### Análisis e interpretación

Luego de realizar el tamizaje fotoquímico del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", podemos resaltar la presencia en abundante cantidad de saponinas, esteroides y en regular cantidad glicósidos.

En un trabajo de investigación de *Chenopodium quinoa* Willd "quinua", del extracto acuoso de las semillas, presenta metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas, flavonoides y glicósidos. (Lozano & et al 2012).



Figura 3. Índice de hemólisis de la saponina de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana". Ayacucho, 2018. (Según Bruneton 2001).

### Análisis e interpretación

En la prueba cualitativa de hemólisis ninguno de las muestras estudiadas presentó hemólisis, probablemente debido a que se utilizó una concentración baja de saponina, los cuales fueron comparados con un estándar de saponinas, el cual no mostró un halo de hemólisis. Guzmán & et al (2015) manifiesta que los resultados de los ensayos de hemotoxicidad, presenta un valor de  $HC_{50}$  de 0.58 mg/ml, y la hemólisis de glóbulos rojos pudo observar que a una concentración de saponina 0.320 mg/ml un 32.215 % de glóbulos rojos son lisados, valor que muestra un grado de toxicidad no muy elevado.



Figura 4. Índice de espuma de la saponina de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana". Ayacucho, 2018.

### Análisis e interpretación

En la prueba cualitativa de espuma se puede notar en la figura la presencia de esta espuma con altura mayor de 2mm y una persistencia de más, con lo cual se considera la prueba positiva. Finalmente la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) para las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" sobre *Daphnia sp* es 519.4185 ppm. El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana", indica abundante cantidad

de saponinas, esteroides y glicósidos en regular cantidad. Las saponinas de *Colletia spinosissima* Gmelin "tacsana" no presentan actividad hemolítica sobre glóbulos rojos (GR) humanos O+. Guzmán y et al (2015) manifiesta que la ecotoxicidad sobre *Daphnia magna* muestran que a una concentración de 25% p/v, los extractos de saponinas no son significativamente tóxicos para el medio ambiente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Castro de la Mata Ramiro, Zavaleta Martínez-Vargas Alfonso. (1998). Programa en "BASIC" para el cálculo de DL50 por el método de Probits. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública [Internet]. 1998 ene [citado 2019 Mar 23]; 15(1-2): 45-54. Disponible en:

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46341998000100009&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341998000100009&lng=es)

Guzmán, B. y Tenorio, R. y Cruz, D. y Espinal, C. y Alvarado, J. y Mollinedo, P. (2015). Saponins from *Chenopodium quinoa* Willd and *Chenopodium Pallidicaule* Aellen As Biocontrollers of Phytopathogen Fungi and Hemolysis Agents. Revista Boliviana de Química, [en línea] 32(1), pp. 8 - 14. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339683002>

Hasewaga, A. y Miyamoto, M. (1998). Patente número 10-324893 Detergente lavaloz. Agencia de patente de Japón (JP).

Hernández, A. C. y Hermosilla, V. J., (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. Tesis de Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Disponible en URL:

<https://core.ac.uk/download/pdf/35292891.pdf>.

Hernández S., R., & Lugo C., E., & Díaz J., L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. e-Gnosis, (3), 0.

Lozano, M. y Ticona, E. y Carrasco, C. y Flores, Y. y Almanza, G. (2012). Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. Revista Boliviana de Química, [en línea] 29(2), pp.128-135. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426339678002>

Martínez, F. y et al, (2008). Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia Daphnidae disponible en URL: [http://www.sepi.enb.ipn.mx/OferEducativa/Maestria\\_CQB/Documents](http://www.sepi.enb.ipn.mx/OferEducativa/Maestria_CQB/Documents).

Miranda, M. y Cuellar, A. 2000 Manual de prácticas de laboratorio; Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, Cuba.

Martínez, S. y et al 2010 Nuevo micro-bioensayo de ecotoxicidad de extractos acuosos de plantas medicinales sobre *Daphnia magna* sp. Instituto de Investigaciones en Productos Naturales. Carrera de Ciencias Químicas. Carrera de Ciencias Biológicas Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia Revista Boliviana de Química Volumen 27, No.1 –2010.

Pino, L. 2015 Actividad larvicida del extracto acuoso de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" sobre larvas en estadio III de *Culex quinquefasciatus* "zancudo". Ayacucho, 2013. Tesis UNSCH.