

Estudio y utilización de dos especies vegetales para la obtención de un medicamento piloto rico en minerales y omega-3

Miguel Martínez¹, Claudia Pereira¹, Fidelina González¹, Bonifacia Benítez¹, María Verdam², Obdulio Miguel², Cristina Miyazaki²

¹Laboratorio de Análisis de Recursos Vegetales-Área Fitoquímica. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad Nacional de Asunción-Paraguay.

²Laboratorio de Fitoquímica. Facultad de Farmacia – Universidad Federal de Paraná-Brasil.

E mail del autor: miguelangelquimi@hotmail.com

Estudio y utilización de dos especies vegetales para la obtención de un medicamento piloto rico en minerales y omega-3. Se realizaron los estudios morfoanatómicos y micrográficos, de las especies vegetales *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn y *Medicago sativa* L., con el fin de comprobar la autenticidad de las mismas, para ser utilizadas en la formulación de un medicamento piloto, que a la vez podría servir perfectamente como un suplemento nutricional, gracias al valioso contenido químico de ambas. En cada una de ellas se detecta la presencia de minerales como el sodio, potasio, manganeso, calcio, magnesio, hierro y zinc, indispensables para la homeostasis. Ensayos de identificación por cromatografía gaseosa acoplada a masas, delata la presencia de Omega-3, importante en la prevención de problemas cardiovasculares, contribuyendo eficazmente con la disminución de los niveles de triglicéridos y colesterol (Kris P., 2003). Los minerales mencionados con anterioridad, así como el Omega-3, contenidos de forma natural dentro de las células de las especies vegetales involucradas en esta investigación, son potenciados, al ser mezclados con resveratrol, que combate radicales libres agresivos para las células humanas, contribuyendo de esa manera a aumentar la longevidad de las mismas, retardando la vejez. Ensayos preliminares toxicológicos como el test de hemólisis y el bioensayo de letalidad con *Artemia salina*, fueron realizados en los extractos de cada especie vegetal, así como en el medicamento piloto propuesto, generando resultados interesantes que han demostrado la baja o nula toxicidad de las mismas.

Palabras Claves: *Medicago sativa* L. - *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn - resveratrol.

Study and uses of two vegetable species to obtain a tentative medicine rich in minerals and omega-3. Morphoanatomic and micrographic studies on *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn y *Medicago sativa* L. were performed in order to validate their characterization and uses. A tentative medicine using these two vegetable species is evaluated based on their nutritional and chemical composition. Both species contains minerals like sodium, potassium, manganese, calcium, iron and zinc, important for homeostasis. Also, Gas chromatographic-Mass spectroscopic (GC-MS) results show the presence of Omega-3, which prevent cardiovascular problems and contribute to minimize triglycerides and cholesterol values (Kris P., 2003). Minerals and Omega-3 elements naturally found in these vegetable species are enhanced by mixing with resveratrol. Resveratrol fights free radicals that are harmful to human cells improving their life time. Furthermore, toxicological studies like the hemolysis test and lethal bioassays with *Artemia salina*, were performed at the vegetal extract and the tentative medicine, resulting in low or none toxicity.

Keywords: *Medicago sativa* L. - *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn - resveratrol.

INTRODUCCIÓN

Durante siglos las plantas constituyeron los únicos medicamentos con que contaban los seres humanos. Resulta sorprendente notar, que los productos naturales están implicados en el desarrollo del 52% de todos los medicamentos nuevos, a pesar del increíble desarrollo de la química farmacéutica sintética y de la fermentación microbiana (Newman et al., 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1976, promueve la utilización apropiada de los sistemas tradicionales de medicina, como parte de los programas de Atención Primaria de Salud, que comprende el empleo de plantas medicinales y de la acupuntura (Soler et. al., 1997). La OMS y muchas organizaciones prestigiosas, fomentan y financian planes de desarrollo, con el objetivo de fundamentar, con el debido rigor científico, la utilización de las plantas medicinales; es decir, se recomienda que se efectúe la aplicación de las plantas medicinales sobre una base científica que valide la efectividad terapéutica y la relativa inocuidad de las mismas (Soler et. al., 1997).

La necesidad de prevenir, mejorar o tratar enfermedades, es uno de los problemas más grandes que obliga a los científicos del mundo entero a generar nuevos fármacos o fitofármacos, para afrontar los problemas o dolencias que generan dichas enfermedades (Vincent et. al, 2002).

Este trabajo de investigación utiliza como base fundamental lo mencionado por Vincent, razón por la cual se evalúan a las especies vegetales *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn y *Medicago sativa* L., para aprovechar el contenido de minerales de ambas, indispensables para catalizar innumerables reacciones enzimáticas para la homeostasis. El medicamento piloto

formulado a base de éstas dos especies vegetales, que proporcionan sodio, potasio, manganeso, calcio, magnesio, hierro y zinc, es potenciado con resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) de origen sintético, un potente antioxidante (Martínez, J., 2000) que reacciona con los radicales libres agresivos para las células, actuando como defensor de las mismas, manteniéndolas en buen estado y aumentando de esa manera su longevidad. El medicamento piloto protegerá a las células de radicales libres, contribuirá a una buena homeostasis y reducirá el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria gracias a las propiedades del resveratrol (Pace-Asciak, C., 1995).

El mercado de los productos de fitoterapia, ha experimentado asimismo una dinámica evolución. Cuantitativamente los europeos gastaron en 1995, 35 mil millones de francos en productos farmacéuticos a base de plantas (Villar del Fresno, 1998).

El medicamento piloto propuesto en este trabajo de investigación, es una opción válida para lo que se pretende, además de poder utilizar materia prima encontrada sobre suelo paraguayo y en el futuro poder generar fuentes de trabajo para compatriotas, comenzando desde la plantación de la materia prima, así como todos los pasos del proceso que implique llegar a un producto seguro y de buena calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL DE ESTUDIO

Equipos

Revelador con luz UV de 264 y 366 nm de la línea Spectroline Q-22NF de Spectronics Corporation. Espectrofotómetro

UV-Vis modelo Shimadzu serie 160 A. Espectrómetro de Absorción Atómica modelo Termo Electrón Solar S2. Espectrómetro de Absorción Atómica modelo Shimadzu AA7000. Cromatógrafo gaseoso acoplado a masas modelo HP GCMS 6890/5973 con inyector automático. Digestor Kjeldahl marca GERHARDT modelo KI 11-26. Microscopio óptico marca OLYMPUS serie BH2. Cámara digital MOTICAM 352. Mufla marca Haeraeus.

Reactivos químicos

Agua calidad destilada y desionizada. Los reactivos grado pro-análisis utilizados fueron de las marcas Merck, Baker, Anedra y Cicarelli, se mencionan a continuación: etanol, metanol, ninhidrina, isobutanol, cloruro de sodio, gelatina, yodo bisublimado, yoduro de potasio, carbonato de sodio, subnitrito de bismuto, cloruro de mercurio (II), cloruro de hierro (III), acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, hexano, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, éter de petróleo, anhídrido acético, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, carbonato de calcio, óxido de magnesio, cloruro de potasio, cloruro de manganeso, hierro metálico, zinc metálico, acetato de amonio, hidróxido de amonio, o-fenantrolina y saponina purificada MT. El ácido alfa-linolénico, así como el resveratrol utilizados, fueron de grado farmacéutico y el metanol grado cromatografía gaseosa. Las placas con base de aluminio utilizadas fueron de Silica gel 60F₂₅₄ previamente recubiertas, de la marca Merck.

Materiales biológicos

Sangre bovino fresco
Huevos de *Artemia salina*

Colecta de los especímenes vegetales en estudio

Las especies vegetales involucradas en el estudio, fueron colectadas en la ciudad de San Antonio del Departamento Central con coordenadas geográficas 25° 25' 39" S, 57° 32' 43" O, para el *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn; y para el *Medicago sativa* L. las coordenadas geográficas 25° 40' 25" S, 56° 57' 04" O, perteneciente a la ciudad de Sapucaí del Departamento de Paraguarí.

Preparación de especímenes "voucher" como material de herbario

El secado, envenenado y montaje de ejemplares fue realizado según metodología convencional para tratamiento de especímenes. Los especímenes voucher fueron depositados en el Herbario FACEN, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción.

Identificación Taxonómica y descripción de los especímenes vegetales

La identificación correcta del material vegetal, con ayuda de un botánico, es un paso indispensable antes del estudio fitoquímico, farmacológico y/o toxicológico (Hostettmann K. et. al., 2008), y más aún si se trata de utilizar la(s) especie(s) para la elaboración de un producto de cualquier tipo destinado al consumo humano.

La determinación se realizó utilizando claves de identificación taxonómica de Burkart (1943), Cabrera & Zardini (1978) y a través de la comparación con material de herbario identificado.

Caracterización Morfológica

Se siguió la metodología convencional de caracterización morfológica, con observación directa y al microscopio estereoscópico (D'Ambrogio, 1986).

Caracterización Anatómica

El material fue hidratado con agua destilada por 4 horas. Se realizaron cortes transversales a mano alzada de hojas y tallos, posteriormente se aplicó tinción directa con safranina. Para la detección de almidón, así como la de grasas-aceites, se tiñeron el material con lugol y sudan III respectivamente. Las láminas fueron montadas con la técnica gelatina-glicerina (D'Ambrogio, op. cit.) y depositadas en el herbario FACEN. Las microfotografías fueron tomadas con cámara digital MOTICAM 352 incorporada al microscopio óptico, editadas con el software Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group, 2006).

Preparación de los materiales vegetales para extracción y uso

Cada material vegetal implicado en este trabajo fue secado a temperatura ambiente, con escasa aireación, bajo sombra, para evitar la acción del oxígeno, la luz, la temperatura y la acción de microorganismos, factores que podrían transformar los compuestos originales en artefactos (Haostettmann et. al, 2008).

Molienda y tamizado del material vegetal seco

La molienda se ha realizado con la ayuda de un molino de mano tradicional, y el tamizado por medio de un tamiz de acero

inoxidable de 0,5 mm de diámetro para obtener la máxima homogeneidad del micropolvo.

Ensayos preliminares de Toxicidad in Vitro de las especies vegetales involucradas en el medicamento piloto y de la formulación propiamente dicha

Es muy conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes la utilizan (Roig J., 1974). Por esta razón es importante realizar investigaciones sobre la toxicidad de las plantas medicinales utilizadas, más aún para este tipo de trabajo, en el que se propone un medicamento piloto en cuya formulación se encuentran 2 especies vegetales extremadamente interesantes desde el punto vista de su contenido químico, que favorece a la homeostasis. No solo es importante realizar ensayos de toxicidad en los extractos por separado, sino también en la formulación del medicamento propuesto, para descartar toxicidad por formación de otros compuestos que podrían formarse en solución por incompatibilidad entre los compuestos químicos de las especies vegetales involucradas.

El test de *Artemia salina*, es un bioensayo de letalidad, muy utilizado para investigar la citotoxicidad de extractos de plantas medicinales. Al eclosionar, un número conocido de larvas nauplio, fueron aisladas, para ser expuestas a distintas concentraciones de los extractos de las especies vegetales, por un periodo de 24 horas a temperatura ambiente y bajo régimen continuo de luz, para descartar la posibilidad de causar muerte de las larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio, luego fueron contabilizados el número de larvas vivas y muertas, utilizando lupa y luz

incandescente. Este método permitió determinar el valor de la concentración letal media (CL₅₀) (Fernández A. et. al., 2009), a través del método de probits.

Los extractos de las especies vegetales, así como la formulación del medicamento, fueron sometidos a otro ensayo preliminar in Vitro de toxicidad denominado test de hemólisis. El mencionado test es de carácter cualitativo y consiste en observar la actividad hemolítica de los extractos vegetales, comparándolos con la actividad hemolítica de una saponina de concentración 500 µg/mL como referencia. Volúmenes iguales de una suspensión de eritrocitos al 2%, son mezclados con volúmenes diferentes del extracto tomadas de una misma concentración como se muestra en el cuadro 1:

Cuadro 1: Mezcla de volúmenes iguales de la suspensión de eritrocitos al 2% con diferentes volúmenes de extracto tomadas de una misma concentración.

Tubo	1	2	3	4
Extracto vegetal (mL)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampón fosfato pH 7,4 (mL)	0,90	0,80	0,50	.
Suspensión de eritrocitos (2%) (mL)	1,00	1,00	1,00	1,00

La menor concentración a provocar hemólisis completa es determinada después de dejar el sistema en reposo por un periodo específico de tiempo. Un test similar fue hecho simultáneamente con solución de referencia de saponina (OMS, 1998).

Encapsulado del medicamento piloto en la forma farmacéutica de cápsulas

Es bien sabido de que existen factores ambientales externos tales como: temperatura, humedad, presión barométrica, composición de la atmósfera ambiental, luz, otras radiaciones, sonido, estación del año, hora del día, productos químicos, etc., que influyen en el metabolismo de los fármacos. Muchos de los factores mencionados pueden de alguna manera afectar al medicamento, durante el proceso de su elaboración, pudiendo existir la probabilidad de interacciones químicas no deseadas entre los componentes, produciéndose otras moléculas que pudieran llegar a ser tóxicas para el organismo (Korolkovas A. et. al., 1983). Atendiendo lo mencionado anteriormente, fue importante, además de interesante, llevar a cabo la formulación piloto y su posterior encapsulación con el fin de realizar algunos ensayos físicos, químicos, y toxicológicos preliminares, que nos brinden informaciones a grandes rasgos de cómo se comportan en conjunto los integrantes de dicho medicamento piloto, principalmente a nivel toxicológico, es decir, realizar ensayos preliminares toxicológicos in Vitro del medicamento en sí, así como de cada uno de los extractos de las especies vegetales incluidas en el medicamento..

El encapsulado de la formulación piloto propuesta en este trabajo, así como el envasado de las cápsulas elaboradas, fueron realizados en Botica Magistral, farmacia de preparados magistrales, habilitado como tal por el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSP y BS), que a través de su decreto N° 8794 cumple el reglamento técnico que instituye las Buenas Prácticas de Laboratorios (BPLs) para preparados magistrales. Botica Magistral tiene

implementada además la Norma ISO 9001:2008, que garantiza el cumplimiento de los requisitos para un buen sistema de gestión de la calidad.

Métodos utilizados para los ensayos cuali-cuantitativos de los componentes químicos de interés

La determinación de minerales se realizó por el método de Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), con excepción del hierro, que fue determinado por método espectrofotométrico, previa complejación con o-fenantrolina (Standard Methods, 1989). La proteína total en el formulado se determinó por el método Kjeldahl modificado (Colorimetría) (Rodier J., 1981). La identificación de verdolaga, alfalfa y resveratrol en el producto final fue hecha por cromatografía en capa delgada (TLC). Se realizaron ensayos preliminares in Vitro de toxicidad tales como el test de hemólisis (OMS, 2004) y el bioensayo de letalidad con *Artemia salina* (Solís, P., 1993 y Krishnaraju, A., 2006), en cada uno de los extractos vegetales, así como en el formulado final que se compone de la mezcla de los micropolvos de cada especie vegetal en estudio con el resveratrol. El bioensayo de letalidad con *Artemia salina*, así como el test de hemólisis fueron realizados en la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Paraná de la República Federativa del Brasil. El método de Cromatografía gaseosa acoplada a masas (CG-MS) fue el utilizado en la identificación de omega-3 (octadeca-9, 12, 15-trienoico). La cuantificación de este ácido graso no fue factible durante la presente investigación,

debido a que en el mercado paraguayo, no se cuenta con un patrón de alta pureza del octadeca-9,12,15-trienoico para realizar una curva de calibrado a través del cual se pueda cuantificar con exactitud la concentración de dicho compuesto en las muestras, no obstante su presencia pudo ser determinada con extrema facilidad, utilizando un producto farmacéutico con contenido declarado de omega-3, como patrón de comparación, con posterior confirmación del peso molecular de este ácido graso, obtenido gracias a la biblioteca del instrumental con la que se realizó el ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y Descripción Taxonómica de los especímenes vegetales

Medicago sativa L.

Hierba introducida, originaria de Armenia (Burkart, op. cit.), perenne, de 1,5 m de altura. Tallo ramificado, erecto, angulares y sub leñosos en la base. Con rizomas breves, formando en conjunto una corona semienterrada, con numerosas yemas. Rizomas breves. Hojas trifoliadas obovadas, de borde liso hacia la base y aserradas hacia el ápice, glabro en el haz y pubescente en el envés. Las hojas trifoliadas se desarrollan en forma alternada a cada lado del tallo. Inflorescencia en densos racimos terminales. Flores de azules claros. Frutos en vaina espiralada, tienen en su interior varias semillas de forma arriñonada (Figura 1A).

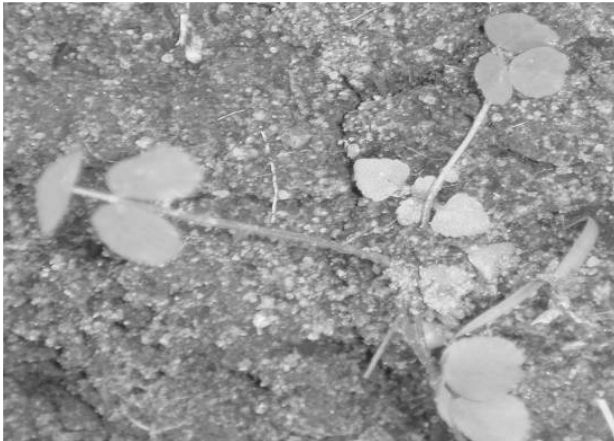


Figura 1A: Plántula de *Medicago sativa* L.

Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn.

Hierba nativa perenne, de vida corta, se desarrolla fácilmente en épocas lluviosas, puede llegar a tener hasta 1 m de altura, de tallo simple, ramificado en la base, el tallo primario es más leñoso, los tallos secundarios son más suculentos. Hojas suculentas o carnosas, alternas, obovadas o elípticas, de 2 a 4.5 cm de largo y 0,5 a 3 cm de ancho, base marcadamente cuneada, pecíolo de 0,3 cm de longitud, ápice emarginado, margen entero. Inflorescencia en panícula, cada flor está sobre pedicelos muy finos. Flores de color rosa a violeta claro, con pétalos caedizos. Fruto seco capsular de forma globosa. (Figura 1B).



Figura 1B: Planta de *Talinum paniculatum*

Caracterización anatómica de Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn.

Foliar: La epidermis es uniestretificada, anfiestomática con paredes anticlinales rectas a levemente onduladas en la cara adaxial y onduladas en la cara abaxial, estomas del tipo anisocítico (Figura 2A-B). La nervadura central es más prominente hacia el envés, constituida por epidermis uniestrata y por debajo de ella se encuentran a ambos lados de la hoja una a dos capas de colénquima, seguido de tejido parenquimático. Rodeado de tejido parenquimático se encuentra el haz vascular del tipo colateral, el xilema se localiza hacia la cara adaxial y el floema hacia la cara abaxial (Figura 2F). El mesófilo es bifacial con simetría dorsiventral distinguiéndose dos tipos de parénquima, en empalizada y el esponjoso (Figura 2E). Entre el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso se encuentra drusas de oxalato de calcio. El parénquima en empalizada está constituido por una a dos capas de células más o menos alargadas. El parénquima esponjoso está compuesto de cuatro a cinco capas de células más o menos redondeadas. En las pruebas histoquímicas foliares se ha detectado la presencia de grasas y aceites en células parenquimáticas (Figura 2C). No se ha detectado la presencia de almidones.

Caulinar: La epidermis es unistrata, por debajo de ella se encuentran dos a más capas de colénquima seguido por varias capas de tejido parenquimático y casquetes de fibras. Los haces vasculares están dispuestos alrededor de la médula formando un anillo continuo. En la parte central se halla la médula formada por tejido parenquimático (Figura 2G). En las pruebas histoquímicas caulinares se ha detectado la presencia de

almidones simples de forma ovoide, tamaño variable, hilo fisurado, ramificado y posición excéntrica (Figura 2D).

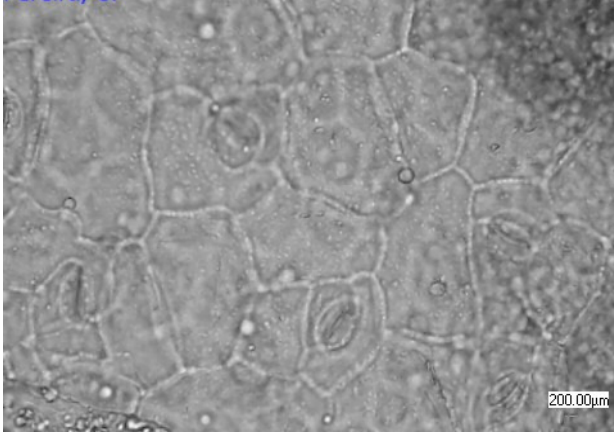


Figura 2A: Epidermis adaxial.

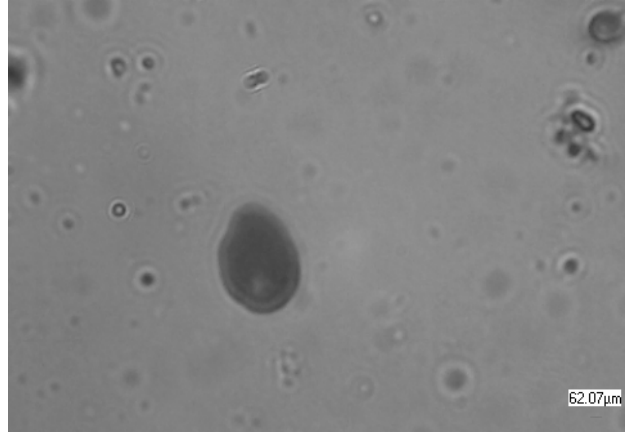


Figura 2D: Almidón.

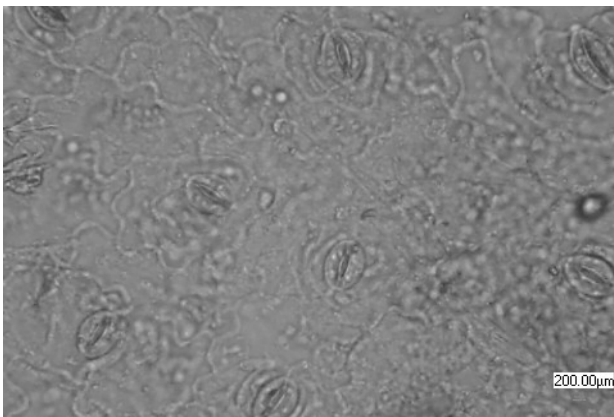


Figura 2A: Epidermis adaxial.

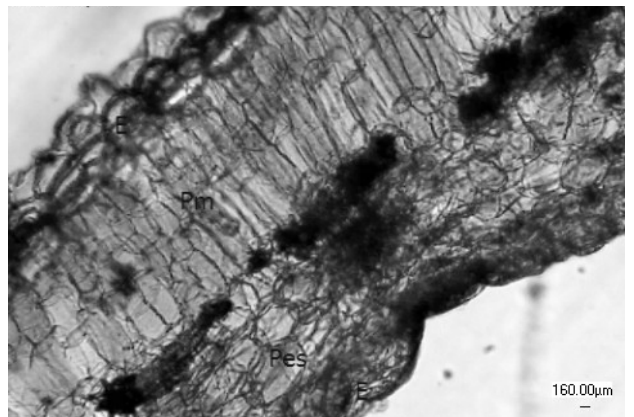


Figura 2E: Mesófilo

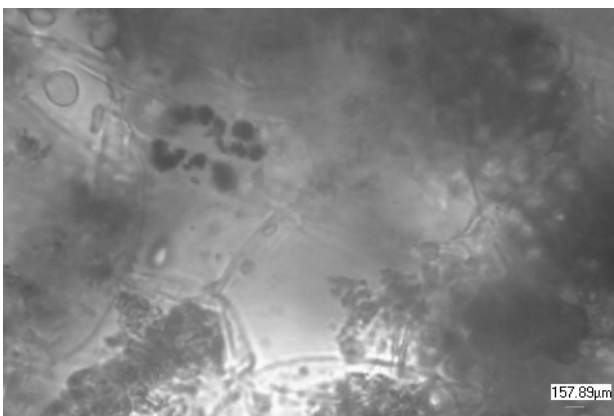


Figura 2C: Parénquima clorofílico

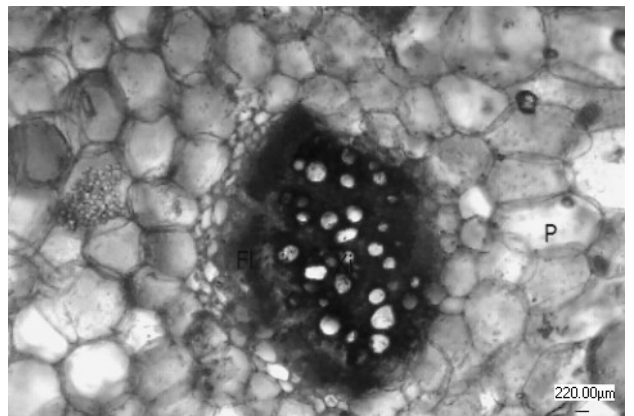


Figura 2F: Sección transversal de la nervadura central.

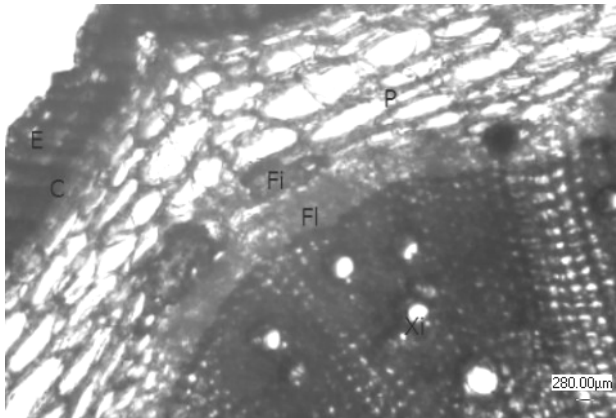


Figura 2G: Tallo en sección transversal mostrando la disposición del haz vascular.

Referencias: E: epidermis; P: parénquima; Fi: Floema; Xi: xilema; M: Médula; Pm: parénquima en empalizada; Pes: parénquima esponjoso; Vh: vaina del haz; Flecha: drusas de oxalato de calcio; Estrella: grasas-aceites

*Caracterización anatómica de *Medicago sativa* L.*

Foliar: La epidermis es uniestratificada, anfiestomática, con paredes anticlinales onduladas con estomas del tipo anomocítico (Figura 3A-B). El mesófilo es bifacial con simetría dorsiventral distinguiéndose dos tipos de parénquima, en empalizado y esponjoso (Figura 3C). El parénquima en empalizada está constituido por una a dos capas de células más o menos alargadas. El parénquima esponjoso compuesto de cuatro a cinco capas de células más o menos redondeadas. La nervadura central es más prominente hacia el envés, está constituido por epidermis uniestrata y por debajo de ella se encuentra una a dos capas de colénquima a ambos lados de la hoja, seguido de tejido parenquimático con presencia de cristales de oxalato de calcio. Rodeado de tejido parenquimático se encuentra el haz vascular del tipo colateral, el xilema se localiza hacia la cara adaxial y el floema hacia la cara abaxial (Figura 3D). En las pruebas

histoquímicas foliares no se ha detectado la presencia de almidones, grasas y aceites.

Caulinar: La epidermis es unistrata, por debajo de ella se encuentran dos a más capas de colénquima seguido por varias capas de tejido parenquimático. Los haces vasculares están dispuestos alrededor de la médula formando un anillo continuo. En la parte central se halla la médula formada por tejido parenquimático (Figura 3E). En las pruebas histoquímicas caulinares no se ha detectado la presencia de almidones, grasa y aceites en el parenquima.

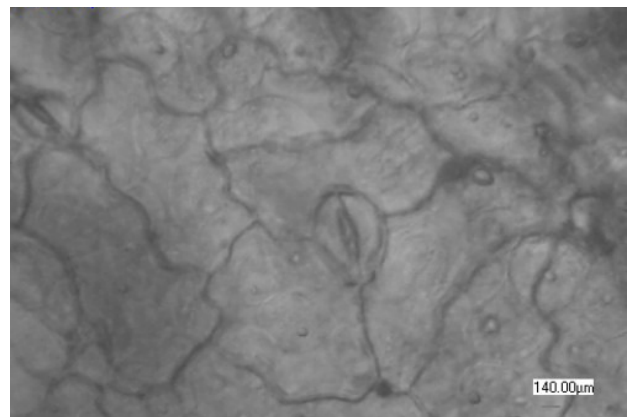


Figura 3A: Epidermis adaxial

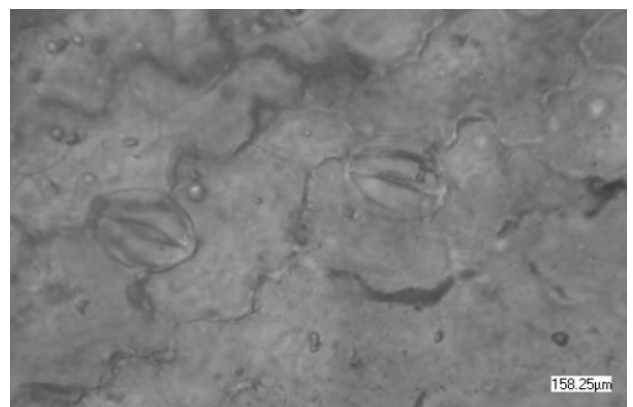


Figura 3B: Epidermis abaxial

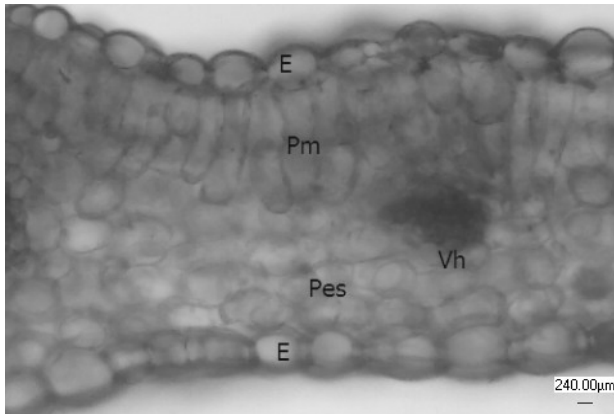


Figura 3C: Mesófilo

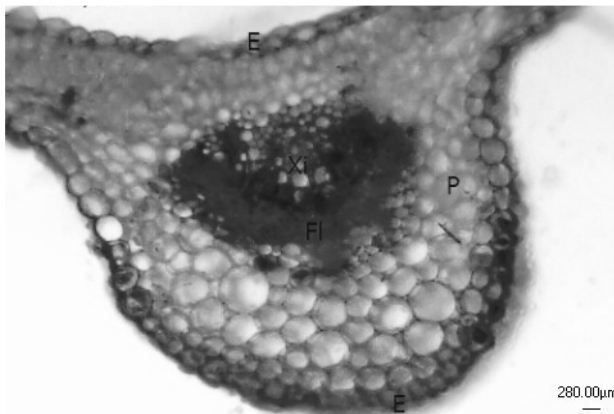


Figura 3D: Sección transversal de la nervadura central

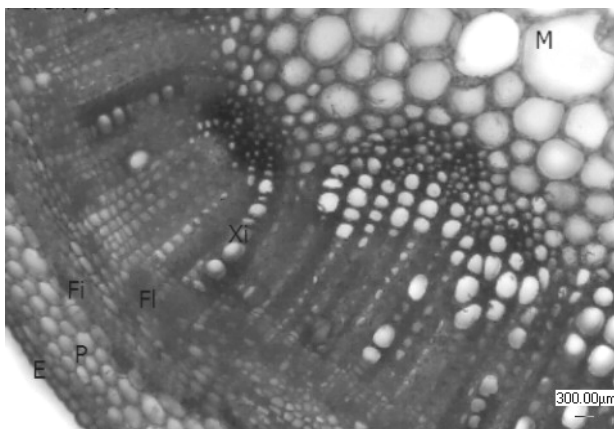


Figura 3E: Tallo en sección transversal mostrando la disposición del haz vascular.

Referencias: E: epidermis; P: parénquima; Fl: Floema; Xi: xilema; M: Médula; Pm: parénquima en empalizada; Pes: parénquima esponjoso; Vh: vaina del haz; Flecha: cristales

Dosaje de los componentes químicos principales de interés en las cápsulas del medicamento piloto

Composición química:

Cada cápsula contiene, ver Cuadro 2.

Cuadro 2: Componentes químicos naturales de interés por cada cápsula del medicamento, enriquecido con resveratrol de origen sintético.

Micropolvo de Hojas y tallo de alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	-----	200	mg.
Micropolvo de Hojas y tallo de Verdolaga (<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq) Gaertn)	-----	200	mg.
Ácido alfa-linolénico (Omega-3)	-----	Presente	
Resveratrol	-----	20	mg.
Proteína	-----	90	mg.
Calcio	-----	5,24	mg.
Magnesio	-----	3,73	mg.
Sodio	-----	3,51	mg.
Potasio	-----	4,52	mg.
Hierro	-----	0,747	mg.
Zinc	-----	12,9	µg.
Manganeso	-----	94,4	µg.
Exipientes	-----		c.s.
V.a.: Oral			

Como puede observarse en el cuadro 2, en la composición química de cada cápsula del formulado, se encuentran minerales indispensables, que catalizan reacciones enzimáticas imprescindibles para la homeostasis. Dichos minerales proveídos por este medicamento piloto, podrían ayudar a potenciar a los minerales suministrados durante el día, a través de la alimentación, a modo de completar la dosis diaria requerida de cada uno de estos elementos, o cubrir la carencia de los mismos, que en muchos casos es debido a una inadecuada alimentación, ayudando así a combatir y/o prevenir ciertas enfermedades asociadas a la falta de dichos minerales. La presencia de omega-3 en la composición química de los vegetales, contribuiría a la disminución de los niveles de triglicérido y colesterol, factores indispensables en la prevención de problemas cardiovasculares. Además de lo

mencionado, la dosis de resveratrol que se encuentra mezclada con las dos especies vegetales estudiadas y utilizadas en este trabajo de investigación, equivale aproximadamente a 7000 mL de vino, que sería necesario consumir para adquirir dicha dosis. El resveratrol es un potente antioxidante, que reacciona con los radicales libres, que son muy reactivos y agresores para las células. De esta manera el resveratrol contribuiría a evitar daños celulares y consecuentemente aumentar la longevidad de las células.

Resultado de los ensayos realizados para minerales en las especies Medicago sativa L. y Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn.

Cuadro 3: Minerales contenidos en la especie vegetal *Medicago sativa L.*

Parámetro	unidad	Resultado
Sodio	mg/g	15,90
Potasio	mg/g	5,99
Manganeso	mg/g	0,0568
Calcio	mg/g	14,7
Magnesio	mg/g	5,16
Hierro	mg/g	Dosado en el producto final
Zinc	mg/g	29,4

Cuadro 4: Minerales contenidos en la especie vegetal *Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn*

Parámetro	unidad	Resultado
Sodio	mg/g	1,66
Potasio	mg/g	16,6
Manganeso	mg/g	0,405
Calcio	mg/g	11,50
Magnesio	mg/g	13,50
Hierro	mg/g	Dosado en el producto final
Zinc	µg/g	34,9

Observando los resultados obtenidos en el cuadro 3 para el *Medicago sativa L.* y el cuadro 4 para el *Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn*, puede notarse perfectamente que dentro de dichos resultados obtenidos para ambas especies vegetales, se encuentran minerales en común, en cantidades interesantes, que serán proveídas al organismo humano a través de las cápsulas que contienen a la formulación del medicamento. La especie vegetal *Medicago sativa L.* posee un contenido superior en sodio, calcio y zinc, con respecto al de *Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn.*, cuya composición en potasio, magnesio y manganeso es mayor en referencia al de *Medicago sativa L.* La cuantificación de hierro, en cada especie vegetal, no pudo ser realizada, debido a inconvenientes técnicos que no fueron superados en el momento en que se han cuantificado el resto de los minerales expresados en los cuadros 3 y 4 respectivamente, pero sí se ha cuantificado en el formulado final como puede observarse en el cuadro 2.

Resultados del Screening Fitoquímico preliminar de Medicago sativa L. y Talinum paniculatum (Jacq) Gaertn.

En el cuadro 5 se puede apreciar que ambas especies vegetales contienen las mismas familias de metabolitos secundarios, pero en diferentes cantidades, estimadas cualitativamente. Los metabolitos secundarios no forman parte del eje central de este trabajo, pero no se las puede dejar de mencionar debido que éstas van incluidas necesariamente dentro de la formulación propuesta, ya que se han utilizado los micropolvos para la preparación del medicamento. Como ejemplo es importante mencionar que los esteroides generalmente

presentan toxicidad y que su dosis tóxica es muy cercana a la dosis terapéutica, razón por la cual este trabajo de investigación sirvió de base para estudios más profundos sobre lo que respecta a los metabolitos secundarios de las especies vegetales involucradas, que se está llevando a cabo actualmente.

Cuadro 5: Screening fitoquímico preliminar de *Medicago sativa* L. y *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn.

Metabolito secundario	Tipo de ensayo	Resultado para <i>Medicago sativa</i> L.	Resultado para <i>Talinum paniculatum</i> (Jacq) Gaertn L.
Saponinas y saponogeninas	Prueba de la espuma	+++	+++
Aminoácidos	Prueba con ninhidrina	+++	+++
Alcaloides	Prueba de Dragendorff, Wagner y Meyer	Dragendorff (+++), Wagner (+), Meyer (+)	Dragendorff (+++), Wagner (+), Meyer (+)
Taninos	Prueba de la gelatina-NaCl	++++	++
Fenoles	Prueba con FeCl ₃	+++	+++
Flavonoides	Prueba por TLC	++++	++++
Esteroles y metilsteroles	Prueba de Liebermann-Buchard	++++	+++
Cumarinas volátiles	Reacción con NaOH	+	++

Leyenda: (-) ausencia, (±) dudoso, (+) presencia leve, (++) moderada, (+++) intensa.

Resultados obtenidos del control de calidad del medicamento

Las cuantificaciones de hierro total, fósforo total y proteína total por cada cápsula, fueron realizadas en el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción (CEMIT-UNA), generando los siguientes valores, según certificado de análisis emitido por el CEMIT-UNA: Hierro 0,747 mg/Cápsula; fósforo total 1,11 mg/Cápsula y proteína total 90 mg/Cápsula. Las identificaciones de resveratrol, *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn. y *Medicago sativa* L., dieron positivas por el método de cromatografía en capa delgada (TLC). El peso promedio del contenido de las cápsulas (doble cero) fue de 777 mg, lo que ha

generado un coeficiente de variación (CV) del 8,75%, siendo el valor máximo permitido 7,5% según la USP, lo que implica que se debe buscar el(los) factor(es) para corregir este error, posiblemente debido al proceso de mezclado, tamización o encapsulado. Este punto no es crítico para los objetivos de esta investigación. La Figura 4A muestra el espectro obtenido para la identificación del ácido alfa-linolénico (Omega-3) por GC-MS. Dicho espectro, delata y confirma la presencia del ácido alfa-linolénico, en el medicamento de grado farmacéutico, utilizado como patrón secundario para la identificación del ácido alfa-linolénico presente en el medicamento piloto (Figura 4B). Si bien la adquisición de patrones de este compuesto en el Paraguay es dificultosa, debido a que no se encuentra en stock, o es de difícil importación, para la identificación del mencionado compuesto en el medicamento piloto, fue suficiente y perfectamente válido el patrón secundario utilizado para su comparación y posterior confirmación a través de la biblioteca del CG-MS. La desventaja de la utilización de un medicamento terminado como patrón secundario de identificación, es no poder dosar al compuesto de interés por medio de ella con la debida exactitud, debido a la falta de información de la pureza del activo dentro del medicamento, así como las interferencias producidas por los excipientes con los que se encuentra mezclado, lo que dificulta la realización de una curva de calibración que genere una ecuación de mínimos cuadrados confiable para su cuantificación.

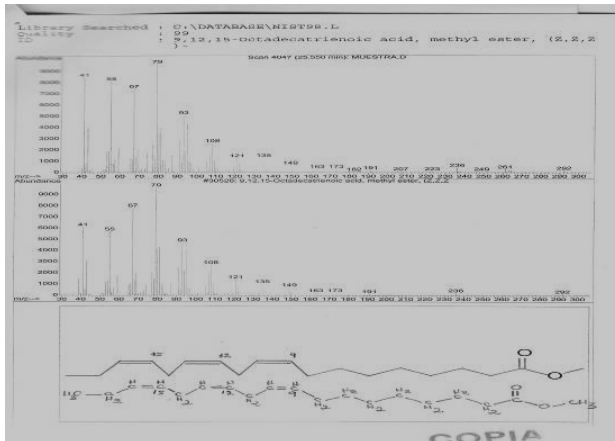


Figura 4A: Espectro obtenido del Producto farmacéutico terminado, con contenido declarado de Omega-3, utilizado como patrón secundario para la identificación de Omega-3 en el medicamento piloto.

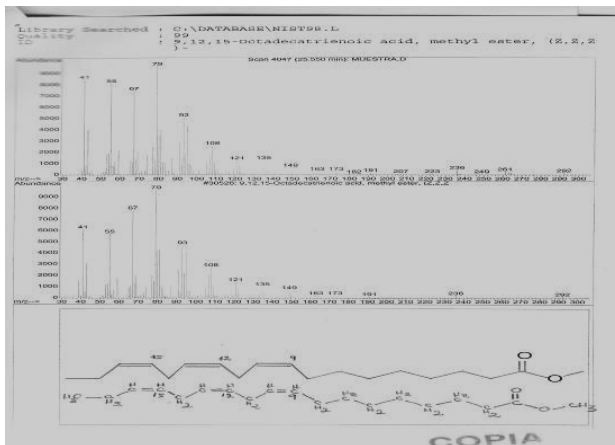


Figura 4B: Espectro obtenido del medicamento piloto en la que se identifica la presencia de Omega-3.

Toxicología

Test de Hemólisis

Este ensayo preliminar de toxicidad, nos ha permitido observar, que en las cantidades de cada micropolvo utilizado para la formulación del medicamento piloto, no existen suficiente concentración de sustancias que produzcan destrucción de los eritrocitos, a excepción de la concentración de 1000 μg de extracto de *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn. por mL de

solución, que fue la concentración más elevada, utilizada para el test. La causa de producción de hemólisis, observada a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, es debido a los posibles tipos de saponinas que posee la mencionada especie vegetal, pero eso no es concluyente para afirmar que causaría el mismo efecto in Vivo. Este ensayo in Vitro muy importante ha demostrado que los extractos de ambas especies vegetales, así como el medicamento piloto, no producen el mencionado fenómeno a las concentraciones deseadas, generando resultados favorables para la formulación propuesta. Como puede observarse en la figura 5A, los eritrocitos han sufrido hemólisis total, debido a que se encuentran en contacto con el control positivo (Saponina purificada MT), a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que en los tubos de la figura 5B y 5C correspondientes a los extractos de micropolvos de *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn. y *Medicago sativa* L. respectivamente, ambas a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se observan a los eritrocitos sin hemolizar en el fondo del tubo.

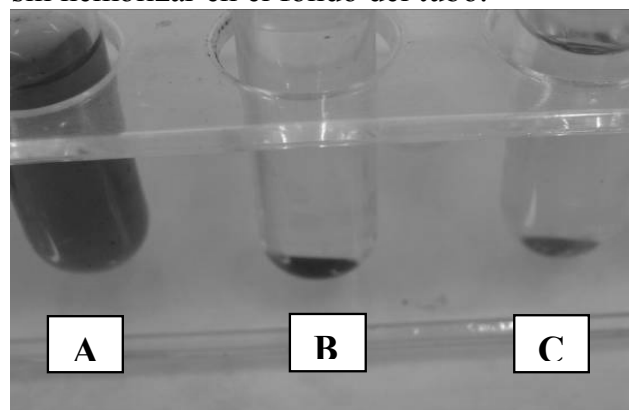


Figura 5: A: Eritrocitos expuestos a una solución hemolizante de saponina purificada MT (Control positivo) a una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. B: Eritrocitos expuestos a una concentración de 500 μg de extracto de *Talinum paniculatum* (Jacq) Gaertn por mL de solución. B: Eritrocitos expuestos a una concentración de 500 μg de extracto de *Medicago sativa* L. por mL de solución.

Test de la Artemia salina

Los resultados obtenidos por medio de este bioensayo de letalidad fueron muy favorables, ya que la cantidad de 10 crustáceos en cada concentración diferente del extracto, realizado por triplicado, de ambas especies vegetales involucradas en la formulación, permanecían vivas a las 24 horas al realizar el conteo de vivos y muertos. Los datos fueron analizados por el método de probits y la DL_{50} fue calculada. Son consideradas fracciones activas aquellas que representaran DL_{50} menor que 1000 ppm (MEYER ET AL., 1982). Basándose en lo mencionado por Meyer, podemos decir que las fracciones ensayadas no fueron activas sobre la *Artemia salina*, es decir no causaron la muerte de los crustáceos. La DL_{50} fue superior a 1000 ppm.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que el medicamento piloto propuesto en este trabajo de investigación, posee minerales indispensables para la homeostasis. La combinación de resveratrol (un potente antioxidante que ayuda a combatir radicales libres agresivos para las células, ayudándolas de esa manera a aumentar su longevidad y retardar su vejez), con los minerales, es una excelente opción, debido a que cubre un espectro importante, para la prevención y/o tratamiento de dolencias o enfermedades, generadas a raíz de la carencia de estos compuestos en el organismo humano. La identificación taxonómica, y la identidad de las especies vegetales delataron la autenticidad de las mismas, que es sumamente importante para los fines de este tipo de investigación.

Se realizaron dos ensayos preliminares de toxicidad in Vitro, que dieron resultados muy favorables, de esa forma, los extractos de ambas especies vegetales, así como el medicamento piloto testados, no se mostraron tóxicos para los modelos utilizados, apenas la concentración más alta presentó actividad hemolítica, que no necesariamente implique que produzca el fenómeno in Vivo. Otros ensayos in Vivo aún se encuentran en ejecución, para poder inferir sobre la seguridad del uso, sin embargo, los tests preliminares indicaron baja o nula toxicidad. Este trabajo sirvió de base para otras nuevas investigaciones y que actualmente se encuentran en desarrollo.

Cuando se compruebe que el medicamento piloto propuesto, satisface los requerimientos establecidos para su consumo, se recomendará su producción, debido a que las especies vegetales utilizadas serían de fácil acceso, realizando una planificación de cultivo, aprovechando su rápido crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Burkart, A. 1943. Las Leguminosas Argentinas silvestres y cultivadas. ACME AGENCY. Bs. As. Argentina. 590 pp.
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia-Fitoquímica-Plantas Medicinales. España: Editorial Acribia, S.A. 1099 p.
- Cabrera, A. L. & Zardini, E. 1978. Manual de Flora de los Alrededores de Buenos Aires. 2º edición. Editorial ACME, Bs. As. 755 pp.
- Cañigual S., Dellacassa, E; Bandoni, L. 2003. Plantas Medicinales y Fitoterapias: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?.

Steviana, Vol. 3. 2011. Martínez et al: Estudio y utilización de dos especies vegetales para la obtención de un medicamento piloto rico en minerales y omega-3

- Acta farmacéutica bonaerense*. Vol. 22 (3): 265-78 pp.
- Castillo, E., Martínez, I. 2000. Manual de Fitoterapia. Valencia-España, 501 p.
- D'Ambrogio, A. 1986. Manual de Técnicas en Histología Vegetal. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur. 84p.
- Dominguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. México: Editorial Limusa, S.A. 281p.
- Evans, W. 1991. Farmacognosia. México: Interamericana Mc Graw-Hill, S.A. 901 p.
- Hostettmann, K., et. al. 2008. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello. 120p.
- Krishnaraju, A., et. al. 2006. Internacional Journal of Applied Science and Engineering: Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp test), Vol. 4 (2): 115-125 pp.
- Marco, J. 2006. Química de los productos naturales. España: Editorial Síntesis, S.A. 284 p.
- Motic China Group. 2006. Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopía digital.
- San Feliciano, A., et. al. 2008. Manual de determinación estructural de compuestos naturales. Bogotá-Colombia: Convenio Andrés Bello. 617p.
- Sharapin, N. 2000. Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia* Vol. 1(3), 197-203pp.
- Soler, A; Porto, M. 1997. Experiencia cubana en el estudio y aplicación de medicamentos herbarios. *Rev Cubana Plant Med*. Vol. 2(1), 30-34pp.
- Solís, P. et. al. 1993. Thieme e Journal-A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). Vol. 59 (3): 250-252 pp. Octubre 2010. <https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/planta-medica/doi/10.1055/s-2006-959661>
- Villar del Fresno, A. 1999. Farmacognosia General. España: Editorial Síntesis, S.A. 355 p.
- Wagner, H. Bladt, S. Zgainski, E. 1983. Plant Drug Analysis. - Berlin-Alemania: Springer. 310p.
- Wagner, H. 2006. Revista de Fitoterapia-Futuro en la investigación en Fitoterapia: tendencias y retos. Zentrum Für Pharmaforschung, Universität München. Vol. 1(2): 101-117pp.
- World Health Organization. 1998. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva-Suiza. Diciembre 2010. <http://www.who.int>
- Zelada, B. 2003. Estudio Taxonómico y Fitoquímico de *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (Asteraceae)-Tesis para optar el título profesional de Biólogo Mención Botánica. Perú. 141p.