4234
26314
1687
63460

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

25 ENE. 1988

CONTRIBUCION AL ESTUDIO FITOQUIMICO DE ALGUNAS ESPECIES VEGETALES QUE PODRIAN INTERVENIR EN LA ETIOLOGIA DE LA HEMATURIA VESICAL BOVINA

CLAUDIO E. PEDRAZA R.

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TITULO DE BIOLOGO

BOGOTA, D.E. 1982

TESIS APROBADA POR:

Dr. FERNANDO VILLAFAÑE A., PhD
Director de Tesis

Dr. RUBEN D. TORRENEGRA
Presidente de Tesis

Dr. JULIO PEDROZO P. MSc
Asesor

Dr. JAIME F. GEORGE PhD
Decano Académico
Facultad de Ciencias

Dra. BERTHA O. DE DULCE PhD
Directora
Carrera de Biología

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

RESUMEN

Se hizo un estudio experimental con el objeto de relacionar algunas plantas con la etiología de la Hematuria Vesical Bovina. Cuatro especies vegetales recolectadas y seleccionadas en una región donde existe un alto índice de hematuria fueron suministradas a ratones (Mus musculus c. swiss albino).

Las especies Hydrocotyle bonplandii, Thelipteris rudis y Thuidium peruvianum se proporcionaron a los ratones en forma de extractos acuosos; la planta Cuphea racemosa se suministró en mezcla con el alimento concentrado. La presencia de estas cuatro especies, ha sido confirmada en otras zonas donde se desarrolla la enfermedad.

Los resultados histopatológicos, permitieron verificar el desarrollo de microhematuria en cada uno de los grupos al que se suministró la especie vegetal.

Se efectuo el estudio fitoquímico de la especie H. bonplandii de la cual se aislaron sustancias con propiedades químicas que pueden tener relación con la etiología de la Hematuria Vesical Bovina.

C O N T E N I D O

		PAGINA
1.	INTRODUCCION	1
2.	REVISION DE LITERATURA	2
2.1	CONSIDERACIONES BOTANICAS Y AMBIENTALES	3
2.2	ASPECTOS FITOQUIMICOS	7
2.3	ASPECTOS FISIOLOGICOS	11
3.	MATERIALES Y METODOS	14
3.1.	ESTUDIO DE CAMPO	14
3.2	SELECCION DE ESPECIES VEGETALES	15
3.3	PRUEBAS BIOLOGICAS	15
3.4	PRUEBAS QUIMICAS PRELIMINARES	18
3.5	MARCHA FITOQUIMICA	22
4.	RESULTADOS	32
4.1	ESTUDIO DE CAMPO	32
4.2	SELECCION DE ESPECIES VEGETALES	32
4.3	PRUEBAS BIOLOGICAS	40
4.4	PRUEBAS QUIMICAS PRELIMINARES	45
4.5	MARCHA FITOQUIMICA	45

C O N T E N I D O

		PAGINA
5.	DISCUSION	52
6.	CONCLUSIONES	58
	BIBLIOGRAFIA	59

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
1.	Especies vegetales colectadas en una región endémica en Hematuria Vesical Bovina	33
2.	Resultados de los Transectos. Número de plantas por cada estación (potrero). Agrupación de especies y estaciones.	39
3.	Diagnóstico Histopatológico en animales que recibieron extractos vegetales.	41
4.	Resultados obtenidos en las pruebas químicas preliminares.	46

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1.	Vista parcial de una zona característica en donde generalmente se desarrolla la Hematuria Vesical Bovina.	4
2.	Fotografía de la especie Hydrocotyle bonplandii.	6
3.	Biosíntesis de Saponinas	10
4.	Especies colectadas en una zona endémica en Hematuria Vesical Bovina suministradas a ratones de laboratorio.	16
5.	Marcha Fitoquímica 1.	24
6.	Marcha Fitoquímica 2	31
7.	Diagrama de Cuadrícula. Coeficiente de Sorensen.	35

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
8.	Dendograma de Mounford	36
9.	Hematuria Vesical Bovina. Caso experimental. Proteína y sangre en la luz de la mucosa vesical	42
10.	Hematuria Vesical Bovina. Caso experimental. Adenoma intestinal	44
11	Espectro U.V. ExtEtOH-$CHCl_3$ SAP 35-40	49
12	Espectro I.R. ExtEtOH-$CHCl_3$. SAP 35-40	50

ABREVIATURAS UTILIZADAS

B.A.W	=	Butanol-ácido acético-agua
T.B.A.	=	Terbutanol-ácido acético-agua
C.C.D.	=	Cromatografía en capa delgada
Ext.	=	Extracto
EtOH	=	Etanol
MeOH	=	Metanol
ExtOH	=	Extracto etanólico
ExtMeOH	=	Extracto metanólico
H.V.B.	=	Hematuria Vesical Bovina
I.R.	=	Infrarrojo
U.V.	=	Ultravioleta
Pf.	=	Punto de fusión
v/v	=	volumen a volumen
m.g.	=	miligramos
ml.	=	mililitros

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis agradecimientos al Dr. Fernando Villafañe del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias del ICA al Dr. Rubén D. Torrenegra y al Dr. Julio Pedrozo P. por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

Igualmente agradezo a:

Instituto Nacional de Salud, Sección Bioterio

Al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

A MIS PADRES Y
HERMANOS

1. INTRODUCCION

La Hematuria Vesical Bovina (HVB) y su incidencia en la ganadería colombiana tiene como consecuencia pérdidas económicas de gran cuantía en algunos de los departamentos dedicados a la cría, levante y producción de leche del ganado vacuno (19, 29).

La Hematuria Vesical Bovina es una enfermedad caracterizada por la presencia de sangre en la orina, como resultado de diferente tipo de lesiones en la vejiga urinaria, lo cual conduce a un estado de anemia progresiva, emaciación y muerte (19, 27, 29).

Por medio del presente estudio, se pretendió relacionar algunas especies vegetales (provenientes de una región endémica en Hematuria Vesical Bovina) con la etiología de la enfermedad, mediante su reproducción experimental en animales de laboratorio y el estudio fitoquímico de una de estas especies, perteneciente a la familia Umbelliferae.

2. REVISION DE LITERATURA

La Cistitis Crónica Hemorrágica o Hematuria Vesical Bovina (HVB) como se conoce en Colombia, es una enfermedad que se encuentra ampliamente distribuída en el mundo. En varios países, entre ellos Australia, Brasil, Bulgaria, Canadá, Filipinas, India, Panamá, Turquía y Yugoslavia, se han realizado diversas investigaciones de las cuales se ha suministrado información (3, 20, 24).

Diversos factores etiológicos de tipo infeccioso, parasitario, genético y tóxico han sido considerados en la HVB; sin embargo, en la mayoría de las áreas donde se desarrolla la enfermedad, ésta parece tener relación directa con la ingestión del helecho Pteridium aquilinum, así como también con el virus del papiloma bovino (BVP). Las lesiones vesicales consisten en hemorragias, congestión, ectasias vasculares, tumoraciones epiteliales del tipo papiloma, adenomas y carcinomas (3, 4, 12, 21, 22, 23, 27, 28, 30).

2.1 CONSIDERACIONES BOTANICAS Y AMBIENTALES

La Hematuria Vesical Bovina se desarrolla preferiblemente en fincas localizadas en zonas montañosas de explotación reciente, a una altura promedio de 1800 metros sobre el nivel del mar, compuestas de suelos ácidos, deficientes en minerales particularmente calcio y fósforo y también en leguminosas y gramíneas. En estas áreas en cambio, abundan los helechos, musgos y otro tipo de especies vegetales ricos en saponias; entre los helechos se destacan: Pteridium sp., Pteris esculentum, Cheilanthes sieberi, Cheilanthes distans, Cheilanthes tenuifolia y Adiantum sp.. También se encuentra Equisetum (cola de caballo) y gran variedad de musgos o lama, (Figura 1) (3, 20, 27).

La familia Umbelliferae, a la que pertenece la especie Hydrocotyle bonplandii cuyo estudio químico se hizo con el objeto de aislar posibles sustancias con propiedades que puedan relacionarse con el desarrollo de la HVB, abarca 2600 especies de las zonas templadas y subtropicales, en su mayoría del hemisferio boreal, desde la base hasta la cumbre de las montañas. La familia se compone de plantas herbáceas, raramente arbustivas o arborescentes, con las hojas esparcidas, casi siempre con una dilatada vaina foliar y con el limbo mas o menos profundo y repetidamente dividido. Se observa gran diversidad de flores den-

FIGURA 1. Vista parcial de una zona característica en donde generalmente se desarrolla la Hematuria Vesical Bovina.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

tro de la familia; son pequeñitas, autógamas o heterógamas y reunidas en umbelas.

Hydrocotyle bonplandii A Rich, conocida como sombrerito de sapo (Cundinamarca), sombrerito de agua (Antioquia) y Chuparán (Almaguer) es una yerba pequeña, rastrera, compuesta de rizomas horizontales con raíces adventicias; hojas pecioladas, orbiculadas y pubescentes.

Inflorescencia simple con involucro o involucelos pequeños, flores terminales pequeñitas de color verdoso, cóncavas, agudas. Los frutos son orbiculares; mericarpos con cinco costillas primarias y sin canales oleíferos. Diferentes especies están distribuídas en Cundinamarca, Cauca, Tolima, Magdalena, Huila, Putumayo y Boyacá (Figura 2) (13, 14).

La clasificación botánica de la especie según García B. (13) corresponde a:

División:	Angiospermae
Clase	Dycotyledoneae
Subclase	Archichlamideae
Orden	Umbelliflorae
Familia	Umbelliferae
Género	Hydrocotyle
Especie	bonplandii A Rich

FIGURA 2. Fotografía de la especie Hydrocotyle bonplandii

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

Para realizar el muestreo de la vegetación presente presente en una región endémica en Hematuria Vesical Bovina, se utilizó el método denominado transecto. Los transectos son de importancia considerable en la descripción de los cambios de vegetación a lo largo de gradientes de desarrollo y allí donde existen marcados rasgos en la topografía. El método simple consiste en trazar una línea a lo largo de la zona a muestrear y colocar cuadrantes de intervalos conocidos a lo largo de la línea. Varias medidas pueden ser usadas en la descripción del transecto, como densidad, frecuencia y cobertura; los datos que se obtienen son susceptibles de representación gráfica (1, 17).

2.2 ASPECTOS FITOQUIMICOS

Entre los numerosos compuestos producidos por una planta, los alcaloides, aceites esenciales, glicósidos, terpenoides, quinonas, flavonoides y otros metabolitos secundarios, pueden o no encontrarse en un vegetal, carecen de función definida en el metabolismo y su abundancia o ausencia proporcionan a una planta características químicas útiles en su clasificación y utilización.

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado C6-C3-C6; se conocen unos 200 flavonoides los cuales se encuentran ampliamente distribuídos entre las plan-

tas en forma libre o como glicósidos (10).

Las coumarinas se consideran derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico, usualmente llamada coumarina; la mayoría se encuentran libres en las plantas, pero se conocen glicósidos del psoroleno y otras coumarinas.
Las antraquinonas y naftaquinonas se consideran como acetogeninas las benzoquinonas pueden provenir del ácido shikímico, unido en ocasiones al ácido mevalónico (5, 10).

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono que teóricamente derivan de la unión de tres fragmentos de isopreno cabeza, cola y otros productos de transposición. Por deshidrogenación pueden formar derivados del naftaleno (10).

Las saponinas son un grupo de heterósidos naturales que poseen la propiedad común de dar soluciones acuosas coloidales con poder emulsionante elevado y que forman espuma persistente al agitarlas. Por hidrólisis dan carbohidratos y un aglucón llamado genéricamente sapogenina que puede tener un esqueleto esteroidal, triterpeno, α-amirinalupeol o de tipo tetracíclico. La principal vía biosintética que conduce a la formación de saponinas de estructura esteroidal o de triterpeno es similar y entraña

el acoplamiento término-terminal de unidades de acetato. Sin-embargo ocurre una ramificación, probablemente después de la formación de escualeno (hidrocarburo triterpenoide) que conduce a los esteroides en una dirección y a los triterpenoides en la otra (5, 7, 10).

Los nitratos y nitritos están implicados en intoxicaciones de vacas, ovejas y caballos, siendo los vacunos los que resultan intoxicados con mayor frecuencia.
Los nitratos son componentes normales de diversas plantas, Silybum marianum (cardo borriquero), Chenopodium album (cenizo blanco), Amaranthus retroflexus y otras plantas que pueden ser responsables de la intoxicación nitrato-nitrica (26). El consumo de estas plantas puede provocar en el ganado abortos, disminución en la producción de carne y leche, retardo en el crecimiento y en casos extremos, la muerte (25).

Varios compuestos químicos como la astragalina, catecolaminas, pteroquilina, ácido fumárico, ácido shikímico, taninos e isoquercitrina han sido identificados en el helecho Pteridium aquilinum (22, 23, 24, 27).

BIBLIOTECA AGR...
DE COLOMBIA

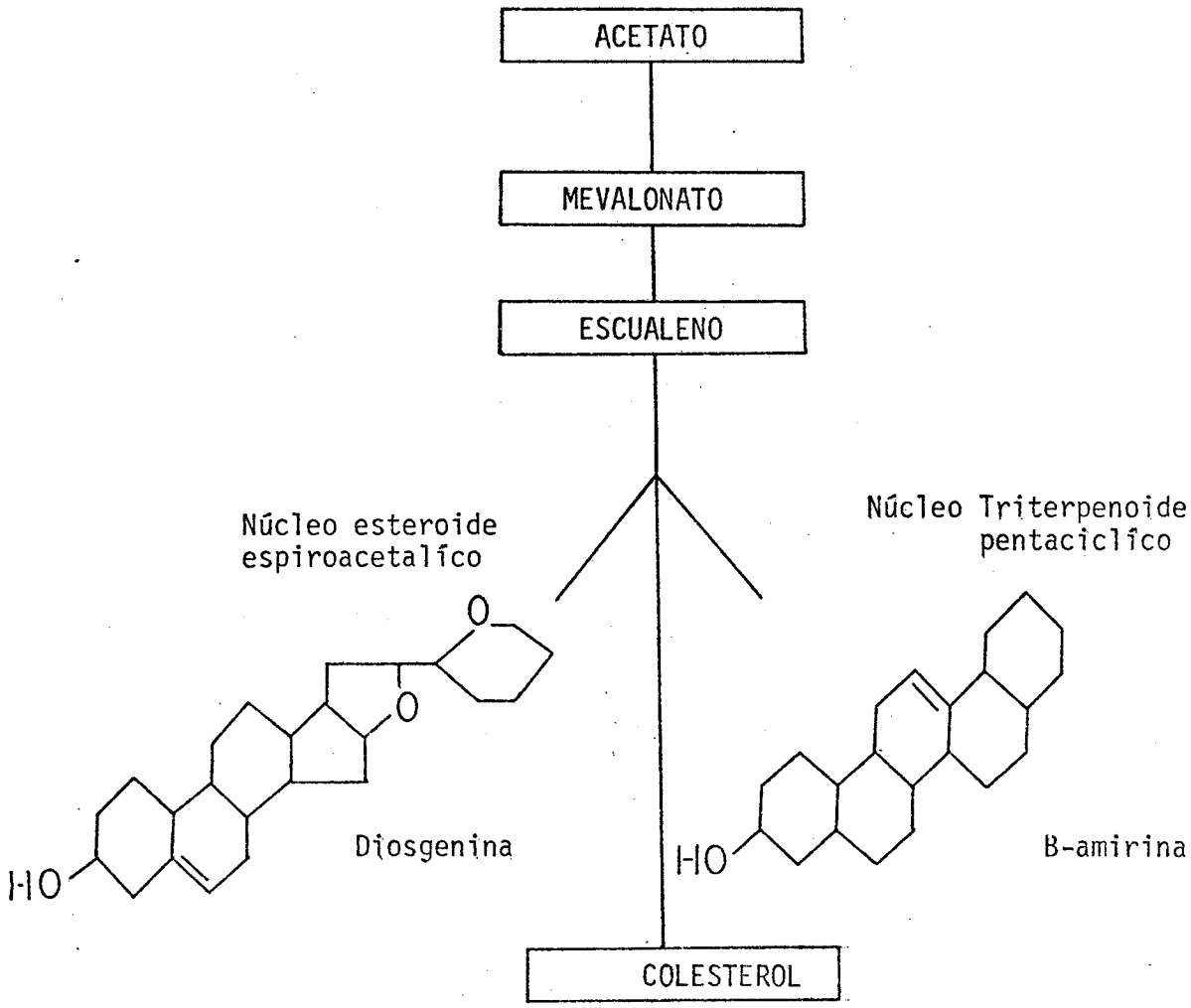


FIGURA 3. BIOSINTESIS DE SAPONINAS

2.3 ASPECTOS FISIOLOGICOS

En leguminosas se han detectado sustancias pépticas con efectos hemaglutinantes; ejemplo de este tipo de proteínas son las fitoaglutininas y lectinas las cuales presentan diferencias en aglutinación de eritrocitos de diversas especies animales. La faseolotoxina presente además del efecto hemaglutinante uno tóxico (8, 18).

Las formas reducidas de Antroquinonas son irritantes y pueden producir lesiones al ser eliminadas por vía renal al igual que la forma oxidada del ácido glioxílico; constituyen el grupo mas numeroso de quinonas, son frecuentes en las Rubiaceae Rhamnaceae y Poligonaceae.

Algunas especies vegetales pertenecientes a las familias de las Pináceas, Lauráceas, Mirtaceas, Umbelíferas, Labiaceas, Rutaceas y compuestas son ricas en aceites esenciales algunos de los cuales producen irritación del tracto urinario y actuan como cancerígenos o cocancerígenos.

Las coumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de Leguminosas, Orchidaceae, Rutaceae, Umbelliferae y en cualquiera de los órganos vegetales. La bishidroxicoumarina im-

pide la coagulación de la sangre al inhibir la síntesis de protrombina en el hígado desplazando la vitamina K de su apoenzima. Administrada en dosis altas produce lesiones y focos necróticos en el hígado; pueden actuar como espasmolíticas, hipercolesterémicas o inhibidores del crecimiento vegetal.

Las sesquiterpenlactonas que se han encontrado en compuestas y algunas umbelíferas poseen acción citotóxica atribuída al grupo exometilen butenólido; son sustancias amargas de farmacología poco estudiada, usualmente reportadas como medicinales (10).

Las saponinas se consideran como venenos protoplasmáticos, ejercen sobre la mucosa una sensación de quemadura y provocan abundantes secreciones. Se encuentran en Liliaceas, Quenopodiaceas, Amarilidaceas y Dioscoreaceas. Tienen acción hemolítica en soluciones diluídas y existe variación de la actividad entre las diferentes saponinas; las mas tóxicas se suelen denominar sapotoxinas. Producen alteraciones estructurales en los lípidos de las membranas celulares y se han estudiado los efectos de ingestión de estos compuestos sobre el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central y varias partes del tracto digestivo (2, 5, 10).

Los nitratos son reducidos a nitritos por los microorganismos del rumen y del intestino; los nitritos primarios o derivados, pasan a la corriente sanguínea y se combinan con la hemoglobina para formar metahemoglobina, la cual no puede combinarse con el oxígeno para transportarlo produciendose hipoxia en grado diferente de la proporción de metahemoglobina formada.

Los nitratos presentes en concentración del 1% pueden ser tóxicos y al 0.5% se considera como el máximo que puede existir sin provocar dificultades (11, 25, 26).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ESTUDIO DE CAMPO

El muestreo de la vegetación, se realizó en cinco potreros (estaciones) sometidos a pastoreo rotacional por vacunos, en una finca situada en la Vereda La Rápida del municipio de San Antonio del Tequendama (Cundinamarca). En cada estación con un área promedio de 20000 metros cuadrados se trazaron bandas de 100 metros de longitud; por medio de una tabla de números aleatorios se seleccionaron sobre cada banda transectos de dos metros de ancho y cincuenta metros de largo, sobre los que se efectuo el reconocimiento y conteo de la vegetación presente, utilizando siempre intervalos de muestreo de diez metros cuadrados.

El muestreo dió como resultado la presencia de veintiuna especies vegetales consideradas aptas para el consumo animal; se colectaron, prensaron y realizó el montaje reglamentario (16). Elmaterial vegetal así procesado se determinó en la sección de Botánica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

Las mismas especies (Tabla 1), fueron confirmadas en fincas donde se han presentado y se presentan casos de HVB y que se hallan localizadas en los municipios de Vélez (Santander), San Antonio

del Tequendama, La Mesa y Pacho (Cundinamarca).

3.2 SELECCION DE LAS ESPECIES VEGETALES

A partir del material vegetal colectado, prensado, montado y cuya determinación se efectuó en el Instituto de Ciencias Naturales, se seleccionaron cuatro especies para efectuar las pruebas biológicas y químicas (Figura 4).

La revisión bibliográfica de las especies y los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas, permitieron descartar algunas de las plantas no tenidas en consideración Tabla 2.

3.3 PRUEBAS BIOLOGICAS

Se realizaron extractos acuosos de tres especies: Hydrocotyle bonplandii (sombrerito de sapo, oreja de ratón), Thelipteris rudis (un helecho) y Thuidium peruvianum (un musgo) en una proporción de un kilogramo de material recien colectado por cada tres litros de agua. Con la especie Cuphea racemosa (pega-pega) se hizo una mezcla de hojas y flor con el alimento concentrado para ratones en la mismma proporción (20, 22, 23, 24).

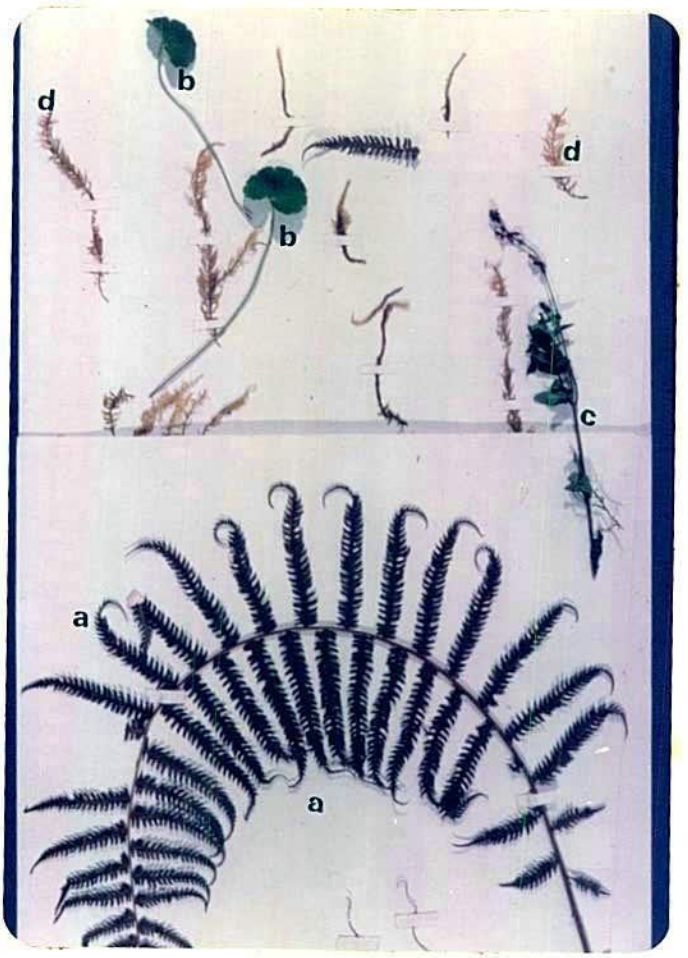


FIGURA 4. Especies colectadas en una zona endémica en Hematuria Vesical Bovina, suministradas a ratones de laboratorio.
a- T. rudis, b- H. bonplandii, c_ C. racemosa
d- T. peruvianum.

Veinte ratones (Mus musculus c. swiss albino) suministrados por el bioterio del Instituto Nacional de Salud fueron utilizados para la reproducción experimental de la Hematuria Vesical Bovina.

Los animales se distribuyeron en cuatro grupos experimentales y un grupo control, correspondiendo a cada uno cuatro ratones. Cada grupo recibió extracto preparado a libertad y alimento concentrado para ratones. El grupo control recibió agua a libertad y el mismo tipo de concentrado.

La edad de los ratones al iniciar el suministro de los preparados era de 25 a 30 días con un peso promedio de 22,6 gramos.

Diariamente se observó el comportamiento de los ejemplares; mediante el empleo de una jaula metabólica se recolectaron muestras de orina con el fin de evaluar la presencia de eritrocitos hemoglobina o proteínas.

Para las pruebas de identificación se usaron tiras comerciales y las pruebas de Amidopurina y Biuret.

Los estudios histopatológicos se llevaron a cabo en la sección de Patología-Toxicología del Laboratorio de Investigaciones Médicas Veterinarias del Instituto Colombiano Agropecuario.

Un ejemplar de cada grupo fue sacrificado periódicamente a los 70, 77, 87 y 94 días después de iniciado el suministro de los extractos acuosos preparados con las cuatro plantas seleccionadas.

Las muestras para microscopía de luz incluyeron: vejiga urinaria,

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

riñón, bazo, pulmón, intestino, hígado, corazón, estómago, ureter, y testículo; las estructuras se fijaron en una solución de formalina tamponada. Se utilizaron las técnicas establecidas en el laboratorio y se procedió al estudio y evaluación histopatológicas.

3.4 PRUEBAS QUIMICAS PRELIMINARES

Para el análisis fitoquímico preliminar se siguió el método de Wall y colaboradores (5, 10).
Para las reacciones de identificación de los diferentes compuestos se utilizaron las mismas especies vegetales suministradas a los animales de laboratorio.

Saponinas

Prueba de la espuma: en un tubo de ensayo se probó si dos mililitros del extracto etanólico y 15 ml de agua formaban espuma. La prueba se considera positiva si después de media hora persiste la espuma.

Prueba de Hemólisis: Se probó si dos ml del extracto etanólico causaban hemólisis en diez ml de sangre previamente estandarizada. Positiva si al observar al microscopio no apareven glóbulos rojos.

Glicósidos cardiotónicos

Prueba de Keller-Kiliani: Se disolvieron 0.5mg de la muestra del extracto en una mezcla recien preparada de un ml.de sulfato férrico al 5% en agua mas 99 ml. de ácido acético glacial; se agregaron dos gotas de ácido sulfúrico y se observó. La prueba es positiva si aparece un color azul al cabo de dos minutos.

Prueba de Legal: dos ml del extracto etanólico se disolvieron en piridina; se adicionóuna gota de nitroprusiato de sodio al 5% y una gota de hidróxido de sodio 2N. La prueba se considera positiva si la reacción colorea rojo.

Flavonoides

Prueba de Shinoda: dos ml del extracto etanólico se trataron con un ml de ácido clorhídrico al 10% y un trozode magnesio.

La prueba es positiva si se obtiene inmediatamente una coloración roja, anaranjada o violeta. Al agregar alcohol isoamílico la coloración pasa a la capa alcohólica.

Alcaloides

El extracto etanólico se calentó con ocho ml de ácido clorhídrico al 1%; enfriada la solución se hicieron pruebas con los siguientes reactivos:

Reactivo de Mayer: Mercuri-yoduro de potasio.

El reactivo se adicionó a la solución previamente acidulada a la cual se le extrajo el etanol. La prueba es positiva si hay formación de precipitado.

Reactivo de Wagner: yodo-yoduro de potasio

Se siguió el mismo procedimiento anterior.

Si existen precipitados color marrón, la prueba es positiva.

Reactivo de Dragendorff: yoduro de bismuto.

La prueba es positiva si dá un precipitado anaranjado marrón.

Taninos

Se evaporó a sequedad parte del extracto etanólico; se disolvió en dos ml.de agua y se buscaron taninos con el reactivo de Cloruro férrico y reactivo de gelatina-sal. Las pruebas son positivas si se forma una coloración negro-azulosa o un precipitado del mismo color al agregar el reactivo de gelatina sal.

Acidos orgánicos y fenoles

Parte del resíduo evaporado hasta sequedad se disolvió en agua y ácido clorhídrico al 1%. Los fenoles son solubles en hidróxido de sodio dando una coloración anaranjada. Son insolubles en bicarbonato de sodio en solución.

Esteroles y Metilesteroles

Prueba de Salkowski: La muestra disuelta en cloroformo se puso en contacto con ácido sulfúrico; si hay colores amarillo o rojo, la prueba es positiva.

Prueba de Liebermann-Burchard: La sustancia problema disuelta en cloroformo se puso en contacto con el reactivo (anhídrido acético y ácido sulfúrico).

La formación de colores azul, verde, rojo indican que la prueba es positiva.

Glicósidos

Prueba de Molisch: Se agregaron unas gotas de naftol en etanol a la muestra; por la pared del tubo se adicionó lentamente ácido sulfúrico concentrado.
La formación de un anillo violeta en la interfase es positivo para la muestra.

Prueba de la Antrona: La solución de antrona en ácido sulfúrico concentrado se agregó a una parte de la muestra. La formación de un color azul o azul-verdoso se considera positiva.

Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet: La prueba es positiva si al agregar el reactivo a la muestra, se forma una coloración anaranjada o roja oscura.

3.5 MARCHA FITOQUIMICA

Hojas de la especie Hydrocotyle bonplandii colectadas

en una región con un alto índice de Hematuria Vesical Bovina se secaron a 40°C; el material vegetal se molió y se pesó. 735 gramos de hojas se extrajeron inicialmente con éter de petróleo y luego con etanol. El líquido del extracto etanólico se floculó con agua. La parte soluble en agua se extrajo sucesivamente con cloroformo, eter etílico y acetato de etilo (Figura 5).

Equipo utilizado en los análisis

Para la determinación de los puntos de fusión en capilar se utilizó un Melt-temp, Divices.

El revelado con luz U.V. de cromatografía en papel y en capa delgada se hizo en un Chromato-vue Modelo CC20.

La extracción del material vegetal se realizó en extractores del tipo Soxhlet.

Los extractos se concentraron en un rotavapor Flash.

Las extracciones líquido-líquido se hicieron en un aparato de extracción contínua.

Para la deshidratación de las sustancias se empleó un hornillo al vacío marca Precision.

El espectro de absorción ultravioleta se corrió en un equipo U.V. Specor UV.Vis. Carl Zeiss con la sustancia disuelta en metanol.

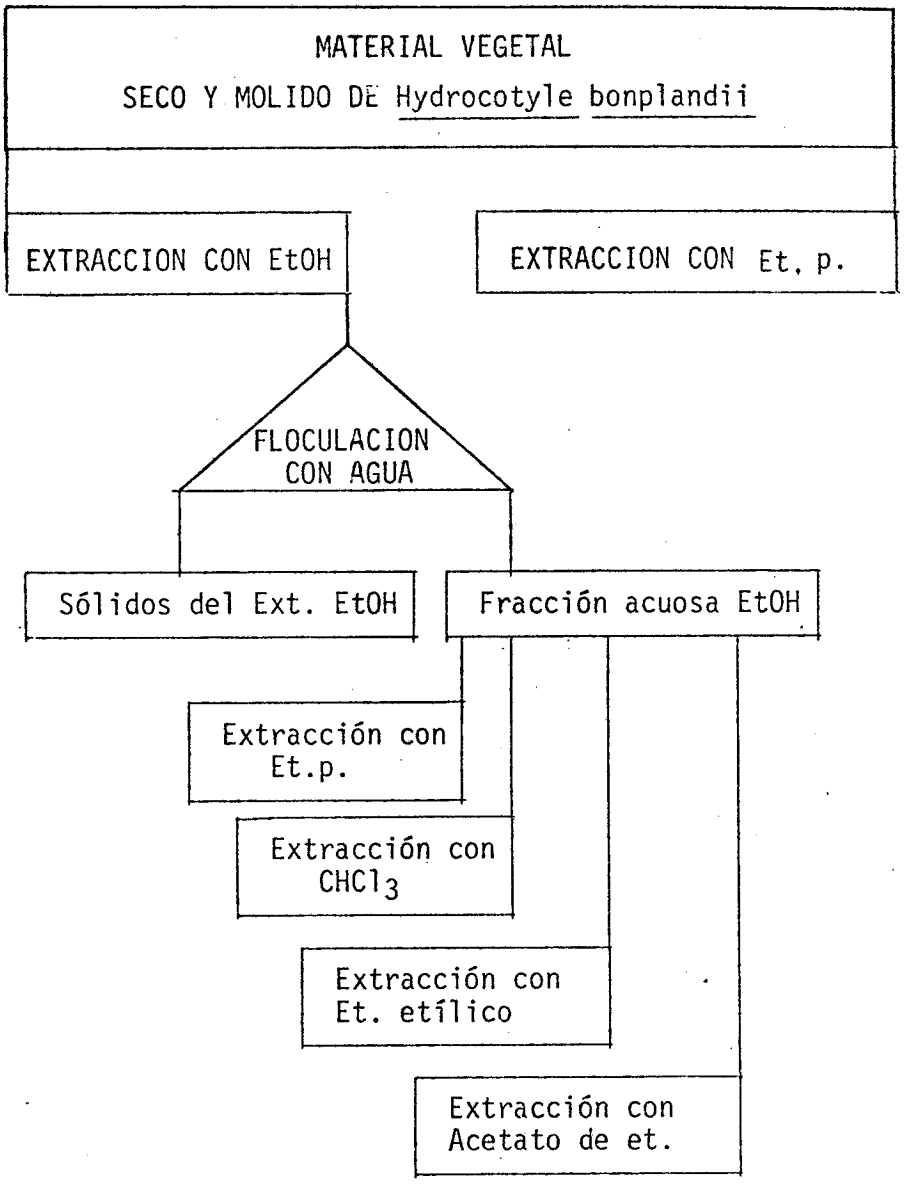


FIGURA 5. MARCHA FITOQUIMICA 1

El espectro infrarrojo se corrió en un Infrarred Spectophotometer Perkin-Elmer 710 B; la medición se hizo en fase sólida en pastilla de bromuro de potasio.

Técnicas Cromatográficas

Para la cromatografía en papel se usó papel Whatman No. 1 y No. 3; cámaras de 24x23x7 centímetros.

Se usaron placas de 2,5x7,5 centrímetros impregnadas con silicalgel 60 para cromatografía en capa delgada y placas de celulosa de 10x10 centímetros con cámaras cromatográficas de 23x14x8 centímetros.

Se emplearon columnas de 1,5 centímetros de diámetro y 30 y 50 centímetros de longitud empacadas con silicagel 60 y celulosa microcristalina para cromatografía en columna.

Extracto Etanólico

Una vez extraído el material vegetal con éter de petróleo se procedió a extraerlo con etanol.

La fracción soluble se filtró, se concentró y floculó con agua El sólido que precipitó se disolvió en metanol y se extrajo con éter de petróleo. El residuo líquido se filtró, se le adicionó agua y permitió la evaporación de otros solventes. La parte acuo-

sa se precipitó con una solución de hidróxido de Magnesio; se dejó secar, se trituró y se extrajo a reflujo con metanol (método de la Magnesia, Rosenthaler) (5). La parte líquida metanólica obtenida se floculó con éter etílico; el sólido obtenido se redisolvió en metanol, se agregó carbón activado, se filtró y fraccionó con acetona.

Al permitir la evaporación de los solventes se obtuvo un sólido de apariencia blancuzca el cual se lavó varias veces con metanol-acetona 6:3 v/v.

Se realizó C.C.D. utilizando como solventes Cloroformo: Me OH 4:2 v/v. Al revelar conluz U.V. aparecieron manchas azules tenues y manchas moradas al revelar con cloruro de cobalto. Se hicieron las pruebas de espuma, hemólisis, antrona y Mollisch.

Una parte de la mezcla obtenida se percoló en una columna de silicagel 60. Se inició la elución con cloroformo y se incrementó gradualmente la polaridad con metanol. Con las diferentes fracciones obtenidas se hicieron C.C.D. utilizando mezclas de solventes de Cloroformo-MeOH en diferentes porciones.

Una segunda muestra fue sometida a diálisis; se emplearon los mismos solventes. Como reveladores se utilizaron cloruro de cobalto ácido tricloroacético al 10%, vapores de yodo y ácido sulfúrico (Marcha fitoquímica2(Figura 6).

BIBLIOTECA AGROPECUARIA

Extracto Clorofórmico

La fracción acuosa del extracto etanólico se fraccionó en un extractor líquido-líquido con cloroformo. La parte soluble en cloroformo se concentró, se disolvío en metanol y floculó con agua.

El sólido obtenido se sometió a idéntico procedimiento al correspondiente al extracto etanólico; el sólido blanco obtenido finalmente, se lavó con MeOH-acetona 6:3 v/v. La cromatografía en capa delgada utilizando como solventes cloroformo-MeOH 4:2 v/v reveló manchas azules a la luz U.V. y moradas al revelar con cloruro de cobalto. Se realizaron pruebas químicas similares y se procedió a unir las fracciones iguales.

Extracto Eter Etílico

La fracción acuosa extraída con etanol y cloroformo se extrajo con éter etílico.

La parte soluble correspondiente se concentró en un rotavapor. Se agregó éter de petróleo y al evaporar los solventes se obtuvieron cristales que fueron lavados varias veces con cloroformo: acetona 6:4 v/v.

Se hicieron cromatografías en papel Whatman No. 2 para los sólidos y la fracción residual, utilizando como solventes B.A.W. 4:1:5

v/v, Forestal 10:30:3 v/v, ácido acético al 15% y T.B.A. 3:1;1 v/v.

Al revelar a la luz U.V. se obtuvieron manchas azules; se determinó el punto de fusión.

Extracto Acetato de Etilo

El residuo acuoso de los anteriores extractos se fraccionó con acetato de etilo en un extractor líquido-líquido y se concentró. Se floculó sucesivamente con éter de petróleo y acetona. La parte soluble se secó y redisolvió en EtOH-agua al 20% que luego de evaporarse permitió la cristalización de sustancias dos de las cuales fueron separadas con una mezcla de acetona-MeOH 2:1 v/v. Se determinó el punto de fusión y se realizaron pruebas químicas para nitratos y cloruros.

El residuo se pasó por una columna de celulosa micro cristalina; las fracciones 23-34 obtenidas se corrieron en papel Whatman No.3 utilizando como solventes B.A.W. 4:1:5 v/v, Forestal 10:30:3 y acético al 15%. Al revelar en una cámara con vapores de amoniaco se intensificaron manchas amarillas que aparecian previamente al revelar con luz U.V. las fracciones se recritalizaron en éter de petróleo.

Extracto Etanol-Cloroformo

Realizadas las pruebas de espuma, Hemólisis, Antrona y Mollisch, hechas cromatografías en papel y capa delgada utilizando como solventes B.A.W. 4:1:1 v/v, Cloroformo-MeOH-Agua 65:35:10 v/v, benceno; acetona 9:1 v/v y Cloroformo-MeOH 4:2 y 7:3 v/v se unieron las fracciones iguales del extracto clorofórmico y etanólico. Como reveladores se usaron vapores de yodo, ácido sulfúrico, cloruro de cobalto y ácido tricloroacético al 10%.

Algunos de los compuestos solubles en metanol se flocularon con acetona-eter de petróleo; la parte metanólica se pasó por una columna de celulosa microcristalina eluyendo inicialmente con cloroformo y aumentando la polaridad con metanol.

En las fracciones No. 35_40 mediante el empleo de C.C.D. utilizando como solventes Cloroformo-MeOH 4:2 v/v se obtuvo una mancha morada al revelar con cloruro de cobalto. Se hicieron pruebas para glicósidos y saponinas. Se determinó el punto de fusión y se corrieron los espectros ultravioleta e infrarrojo (Marcha Fitoquímica 2, Figura 6).

De uno de los residuos del extracto etanólico se obtuvieron cristales para los que se realizaron las pruebas químí-

cas correspondientes a nitratos (sulfato ferroso) y cloruros (nitrato de plata). Se determinó el punto de fusión.

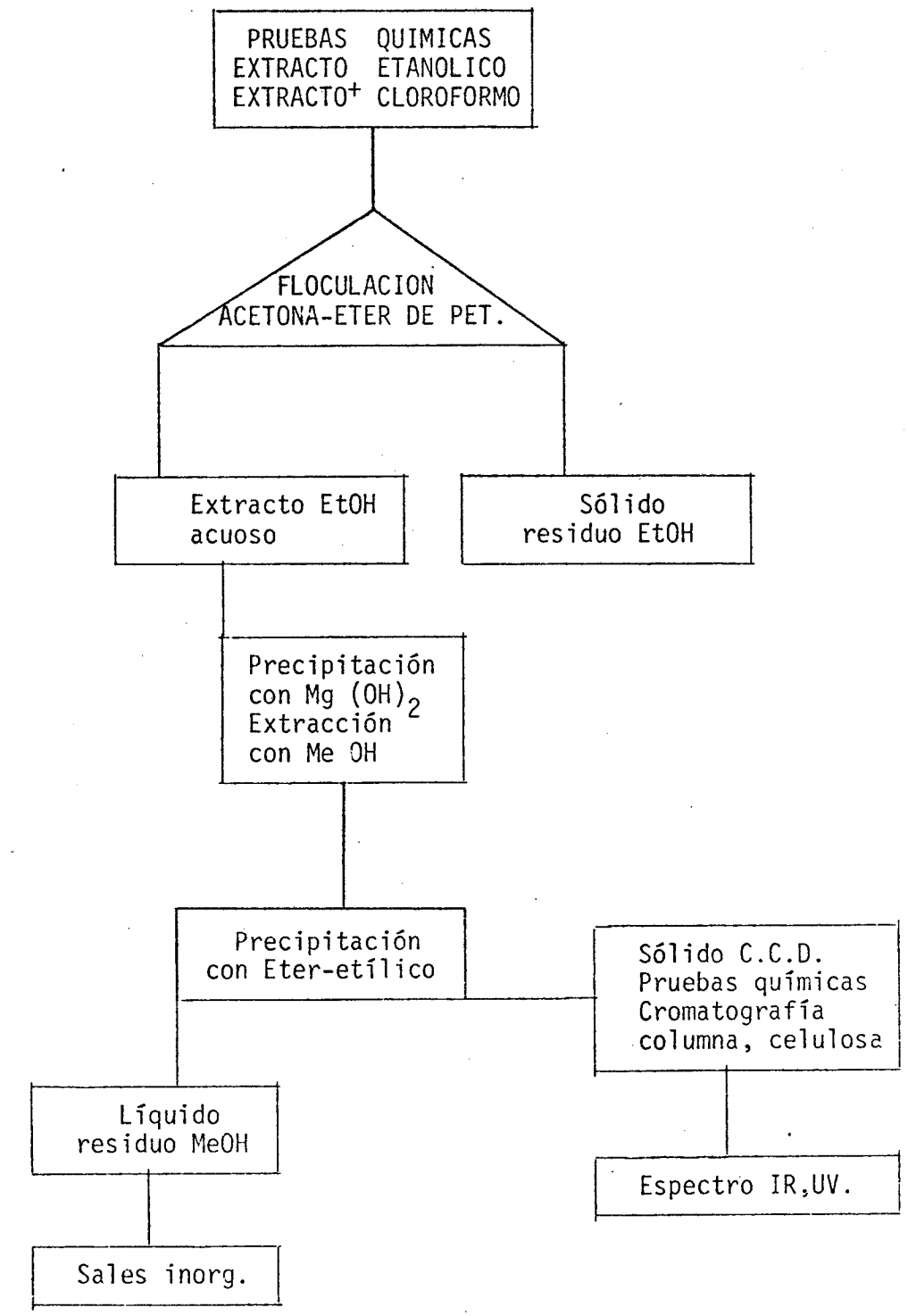


FIGURA 6. Marca fitoquimica 2
Extracto Etanol-Cloroformo.

TABLA 1. Especies colectadas en una región endémica en H.V.B.

Nombre Científico	Nombre vulgar	Toxicidad
Borreria laevis (Lam) Griseb	Botoncillo, tabaquillo cansamozo	Levemente nociva
Cuphea racemosa (LF) Spreng	Moradita, pega-pega	
Desmodium molliculum (HBK) DC.	Junquillo	
Hydrocotyle bonplandii A Rich	Sombrerito de sapo, chuparan, sombrerito de agua.	
Kyllinga pumila Miche	Fósforito, tote negro	Medianamente nocivo
Pteridium aquilinum var arachnoideum (L) Kuhn.	Helecho carnicero, helecho macho	
Sphilanthes oexmifolia (Lam) A.H. Moore	Botón de oro	
Thelipteris rudis (Kae) Proctor	Helechilla	
Pteris muricata Hook		
Bartramia sp.	Musgo o lama	
Breutelia sp.	Musgo o lama	
Campylopus viticulosoides (P.Beauv) Wisk y Morg	Musgo o lama	
Breutelia tomontasa (S.W.) Schimp.	Musgo o lama	
Polytrichum commune Heden	Musgo o lama	
Thuidium peruvianum MItt	Musgo o lama	
Breutelia suburcuata C. Mull	Musgo o lama	
Campylopus sp.	Musgo o lama	

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO DE CAMPO

Las especies vegetales que aparecen en la tabla 1, corresponden a 17 de las 21 especies colectadas en una región endémica en HVB y cuya presencia fue confirmada en otras zonas donde también se desarrolla la enfermedad.

Los datos de la tabla 2, son el número de plantas presentes en los trasectos realizados en cinco estaciones (potreros) en una finca con un alto índice de HVB. Al efectuar el conteo solo se tuvieron en cuenta aquellas especies con tamaño considerable de sus estructuras (hojas) y otras en estado de floración, que en el momento, se supone serían consumidas fácilmente por los bovinos en pastoreo.

4.2 SELECCION DE LAS ESPECIES VEGETALES

Con los resultados obtenidos en el trabajo de campo, se elaboró la tabla 2, así como el diagrama de cuadrícula y el Dendograma de Mounford (Figuras 7, 8).

En la tabla 2, C es la constancia de las especies y es igual al número de potreros (estaciones) en los cuales una de las especies

está presente, sobre el número total de estaciones.

El diagrama de cuadrícula se hizo con los datos calculados para obtener el coeficiente de Sorensen (I) que permite medir la afinidad entre dos especies.

$$I = \frac{2\ j}{a + b}$$

a = número de estaciones en las cuales la especie A está presente.

b = número de estaciones en las cuales la especie B está presente.

j = número de estaciones en que A y B están presentes.

Cuando I = 0 las dos especies se excluyen (nunca se encontraron juntas).

Cuando I = 1 Las dos especies están ligadas (siempre se encontraron juntas.

El dendograma de Mounford se hizo utilizando los valores del diagrama de cuadrícula, en el que los valores del coeficiente de afinidad se han multiplicado por 100 (Figura 8).

	B.1	C.r	D.m	H.b	K.p	P.a	P.m	S.o	T.r	T.p
B.1		75	57	100	100	75	40	40	100	100
C.r			35	75	75	33	33	33	75	75
D.m				75	75	100	80	40	75	75
H.b					100	75	57	57	100	100
K.p						75	57	57	100	100
P.a							80	40	75	75
P.m								0	57	57
S.o									57	57
T.r										100

FIGURA 7. DIAGRAMA DE CUADRICULA. COEFICIENTE DE SORENSEN

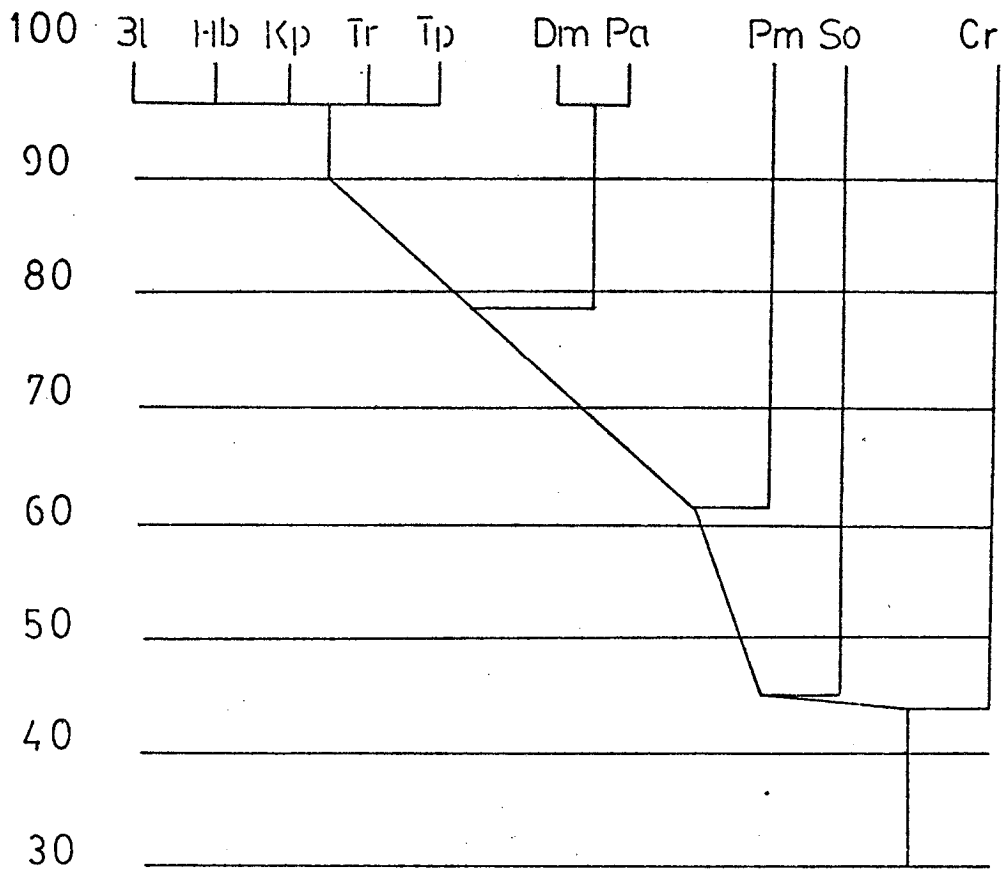


FIGURA 8. DENDOGRAMA DE MOUNFORD.

En la tabla 2 se presenta la agrupación de especies y estaciones; la repartición homogénea de las especies B. laevis H. bonplandii, K. pumila, T. rudis y T. peruvianum en las estaciones 1 a 5 es evidente, son especies constantes (C = 1).

Las especies D. molliculum, P. aquilinum y C. racemosa están ligadas entre ellas formando otro núcleo.
Un tercer grupo está constituído por P. muricata y S. oexmifolia son especies accesorias (C= 0.4) únicamente presentes en dos de las cinco estaciones.

En el diagrama de cuadrícula (Figura 7), las especies H. bonplandii y K. pumila, tienen un alto índice de afinidad (I=1) con B. laevis; por el contrario P. muricata y S. desmifolia no tienen afinidad. (I = 0).

El dendograma de Mounford presenta gráficamente las especies que tienen mas afinidad entre sí B. laevis, H. bonplandii K. pumila, T. rudis y T. peruvianum.
Las especies C. racemosa, S. oexmifolia y P. muricata constituyen un segundo grupo dadas las relaciones con las otras especies vegetales y con ellas mismas.

Los valores del índice de afinidad utilizados para elaborar el dendograma permiten formar un tercer núcleo con las especies D. molliculum y P. aquilinum

Prueba de X^2 (Bonnet, 1966) (1)

La prueba se utiliza para comparar frecuencias observadas con frecuencias teóricas calculadas u otras frecuencias observadas.

La prueba se aplicó a los resultados obtenidos en la tabla 2 con el objeto de conocer si las frecuencias de las especies que aparecen en las tablas eran o no significativamente diferentes en las cinco estaciones o potreros considerados.

La fórmula general aplicada aparece a continuación:

$$X^2 = \left(\frac{a1^2}{t1} + \frac{a2^2}{t2} + \frac{a3^2}{t3} + \frac{a4^2}{t4} + \frac{a5^2}{t5} \right) \frac{T}{ta}$$

$$+ \ldots + \left(\frac{j1^2}{t1} \quad \frac{j2^2}{t2} \quad \frac{j3^2}{t3} \quad \frac{J4^2}{t4} \quad \frac{j5^2}{t5} \right) \frac{T}{tj}$$

El número de grados de libertad es igual a 36 y el valor teórico de X^2 = 23.269 (9)

Con α = 0.005

El valor calculado de X^2 = 54.333

TABLA 2. Resultados de los transectos. Número de plantas por cada estación (potrero) Agrupación de especies y estaciones.

Especie	ESTACIONES (Potreros) 1	2	3	4	5	Vlr. C.	Constancia	
B. laevis	160_{a_1}	724	800	552	47_{a_5}	1	Constante	t_a
H. bonplandii	1870	800	1200	1300	1385	1	Constante	
K. pumila	1900	450	350	800	312	1	Constante	
T. rudis	19	140	58	156	24	1	Constante	
T. peruvianum	1650	1250	1100	675	4425	1	Constante	
D. moliculum	-	23	108	100	-	0.6	Constante	
P. aquilinum	-	67	74	95	-	0.6	Constante	
C. racemosa	478	-	-	8	275	0.6	Constante	
P. muricata	-	1	-	31	-	0.4	Accesoria	
S oexmifolia	$337j_1$	42	-	-	$-j_5$	0.4	Accesoria	t_j
	t_1				t_5			T

4.3. PRUEBAS BIOLOGICAS

Los resultados histopatológicos de los ejemplares a los que se suministró extractos vegetales permiten apreciar que la severidad de las lesiones a nivel de la vejiga urinaria fue mayor en los animales que estuvieron sometidos a un período mas prolongado de ingestión de los preparados de plantas (Tabla 3).

Entre los 70 y 77 días de estar suministrando los extractos, en los ejmplares sacrificados solo se halló contenido proteíco en vejiga urinaria de uno de los ratones pertenecientes al grupo 4 al que se suministró extracto de la especie T. peruvianum A los 87 días de suministro, un tercer ejemplar del grupo 4 presentó sangre en la luz de la vejiga urinaria, al igual que el tercer ejemplar del grupo 5 al que se suministró extracto de la especie C. racemosa. Un ratón del grupo 2, el cual ingirió extracto de H. bonplandii durante 87 días, presentó proteína y sangre en la luz de la mucosa vesical (Figura 9).

Los últimos animales de los grupos 2 y 5 sacrificados a los 94 días, presentaron proteína en la luz de la mucosa vesical y proteína en la vejiga urinaria respectivamente. El cuarto y último ejemplar del grupo 3 que recibió extracto de T. rudis, reportó sangre en la luz de la vejiga.

TABLA 3. Diagnóstico Histopatológico en animales que recibieron extractos vegetales

Código V	Tiempo suministro	Extracto vegetal suministrado	Peso promedio Inic.	Fin.	Lesiones Histopatológicas
1-3 (1)	70 d.	Ext. Ac T r.	22,5	29 g.	Pielitis focal linfocitaria.
2-2 (2)	77 d.	Ext. Ac H b.	21,5	31,7	Pielitis mononuclear focal. Sangre libre en la luz de la pelvis.
2-4 (1)	77 d.	Ext. Ac T p	24,8	32,8	Contenido proteico en vejiga urinaria.
2-5 (1)	77 d.	Ext. hf C r.	23	33,5	Enteritis parasitaria
2-1 (1)	77 d.		21,1	32,8	Pielitis mononuclear focal.
3-2 (2)	87 d.	Ext. Ac H b.	21,5	31,7	Proteina y sangre en la luz de la mucosa vesical.
3-3 (1)	87 d.	Ext' Ac T r.	22,5	29	Pielitis crónica.
3-4 (2)	87 d.	Ext. Ac T p.	24,2	32,8	Sangre en la luz de la vejiga urinaria.
3-5 (2)	87 d.	Ext. hf C r.	23	33,5	Sangre en la luz de la vejiga urinaria.
4-1 (1)	87 d.		21,1	32,8	Pielitis crónica. Luz de la pelvis con sangre.
4-2 (2)	94 d.	Ext. Ac H b.	21,5	31,7	Proteína en la luz de la mucosa vesical.
4-3 (1)	94 d.	Ext. Ac T r	22,5	29	Hemorragía focal en pulmón.
4-3 (2)	94 d.	Ext. Ac T r.	22,5	29	Sangre en la luz de la vejiga
4-4 (1)	94 d.	Ext. Ac T p.	24,2	32,8	Adenoma intestinal?
4-4 (2)	94 d.	Ext. Ac T p.	24,2	32,8	Pielitis crónica, luz de la pelvis con sangre
4-5 (1)	94 d.	Ext. hf C r.	23	33,5	Proteina en la vejiga urinaria.
4-5 (2)	94 d.	Ext. hf C r	23	33,5	Pielitis crónica, luz de la pelvis con sangre .

Edad al iniciar el experimento 25-30 días
Grupo control corresponde al grupo 1

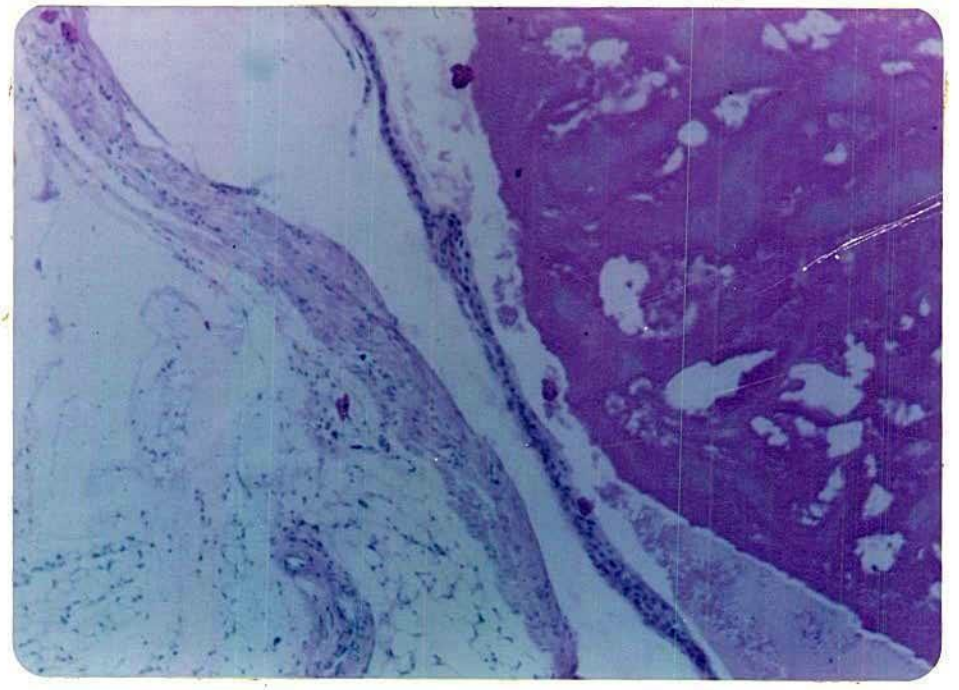


FIGURA 9. Hematuria Vesical Bovina. Caso experimental
Proteína y sangre en la luz de la mucosa vesical.

Los animales del grupo 4 fueron los primeros en reportar contenido proteico en vejiga urinaria y un ejemplar del mismo grupo desarrolló un adenoma intestinal (Figura 10).

Otros ejemplares presentaron diferente tipo de lesiones: en un animal del grupo 3 a los 70 días de suministro de extracto, se observó pielitis focal linfocitaria.
A los 77 días un ejemplar del grupo 2 presentó pielitis mononuclear focal y sangre libre en la luz de la pelvis; en el mismo período un ejemplar del grupo control desarrolló pielitis mononuclear focal.
A los 87 días el ejemplar correspondiente al grupo 3 presentó pielitis crónica. Los ratones pertenecientes a cada grupo que fueron sacrificados a los 94 días de experimentación presentaron las siguientes lesiones: en un animal del grupo 3 se halló hemorragia focal en pulmón. En el último ejemplar del grupo 4 se evidenció pielitis crónica y luz de la pelvis con sangre; estas mismas lesiones se presentaron en el ratón perteneciente al grupo 5.
Las pruebas para proteínas resultaron positivas para los animales de la jaula 2,60 días después de iniciado el suministro del extracto.

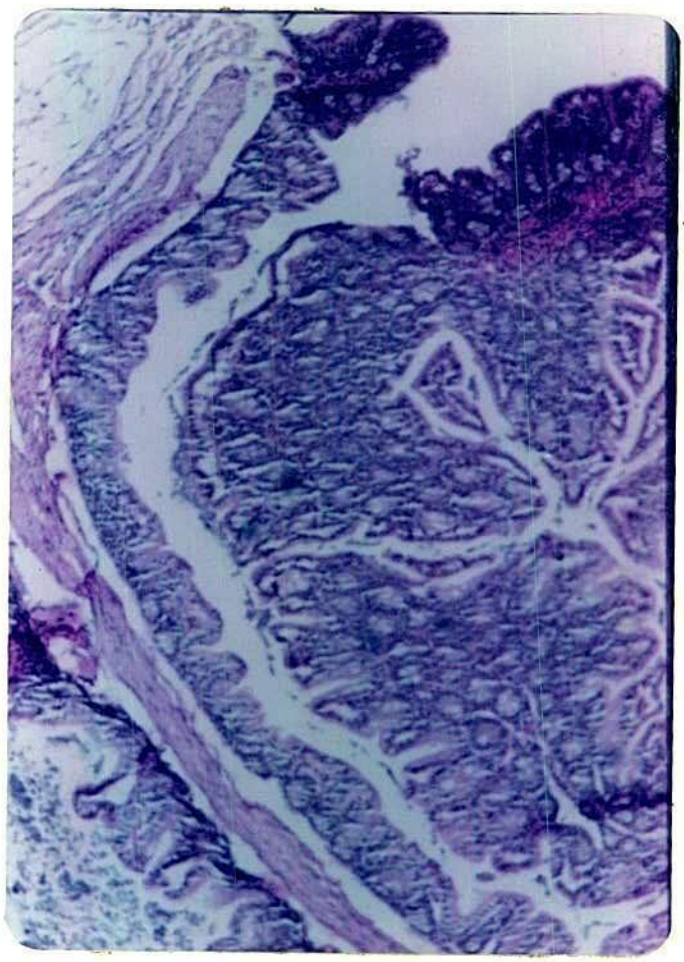


FIGURA 10. Hematuria Vesical Bovina. Caso Experimental . Adenoma intestinal.

4.4 PRUEBAS QUIMICAS PRELIMINARES

Las pruebas químicas preliminares realizadas con las especies H. bonplandii, T. rudis, C. racemosa y T. peruvianum dieron resultados positivos para sustancias comunes a las cuatro especies como las reacciones para esteroles, glicósidos y sesquiterpenlactonas.

Las pruebas para taninos dieron positivas para tres de las especies vegetales y negativa para T. peruvianum.
Las pruebas de espuma y hemólisis para saponinas resultaron positivas para H. bonplandii, T. rudis y T. peruvianum.
Las reacciones para alcaloides fueron negativas para cada una de las especies vegetales (Tabla 4).

4.5 MARCHA FITOQUIMICA

Extracto Eter Etílico

De este extracto se obtuvieron cristales blancos polimorfos.

Solubilidad: metanol, acetona, éter etílico.

Pf = 168-170^{o}C

TABLA 4. Resultados obtenidos en las pruebas químicas preliminares.

Prueba / Especie	Saponinas		Heterosidos		Flavonoides		Alcaloides		Taninos	
	Esp.	Hemol.	Ke-Ki	Legal	Shinod	OH Iso	Drag.	Mayer	Gel-Sal	$FeCl_3$
H. bonplandii	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
T. rudis	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
C. racemosa	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
T. peruvianum	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Prueba / Especie	Ac. Org. Fenol		Esteroles		Glicósidos		Sesquiterpen
	NaOH	$NaHCO_3$	Salk	Lieb.	Antr.	Moll	Baljet
H. bonplandii	+	-	-	+	+	+	+
C. racemosa	-	-	+	+	+	+	+
T. rudis	-	-	-	+	+	+	+
T. peruvianum	-	-	-	+	+	+	+

\+ Prueba positiva
\- Prueba negativa

Extracto Acetato de Etilo

Se obtuvo una mezcla de Flavonoides y sales inorgánicas.

Las sales cristalizaron en forma de agujas y cubos transparentes

Solubilidad: agua

Pf = 337-339°C para el nitrato de potasio

El punto de fusión consultado en lás referencias bibliográficas es de 339°C.

Pf = 780°C para el cloruro de potàsio, teórico.

El potasio se reconoció por su coloración violeta a la llama (15).

Pruebas Químicas

Prueba del sulfato ferroso: positiva para nitratos

Prueba de nitrato de plata: positiva para cloruros

El precipitado de cloruro de plata se disolvió al agregar amoniaco concentrado, reacción con la que se verificó que se trataba de cloruros.

Extracto Etanol-Cloroformo

A partir de este extracto y siguiendo la metodología descrita, se obtuvo una mezcla de saponinas correspondientes

a las fracciones 35-40 eluidas de la columna de celulosa

La apariencia es de polvos amarillo-café

Pruebas Químicas

Prueba de la antrona positiva

Prueba de Mollisch: positiva

Prueba de Lieberman-Burchard: positiva

Prueba de Salkowski: positiva

Prueba de espuma y hemólisis: positivas

Espectro U.V.:

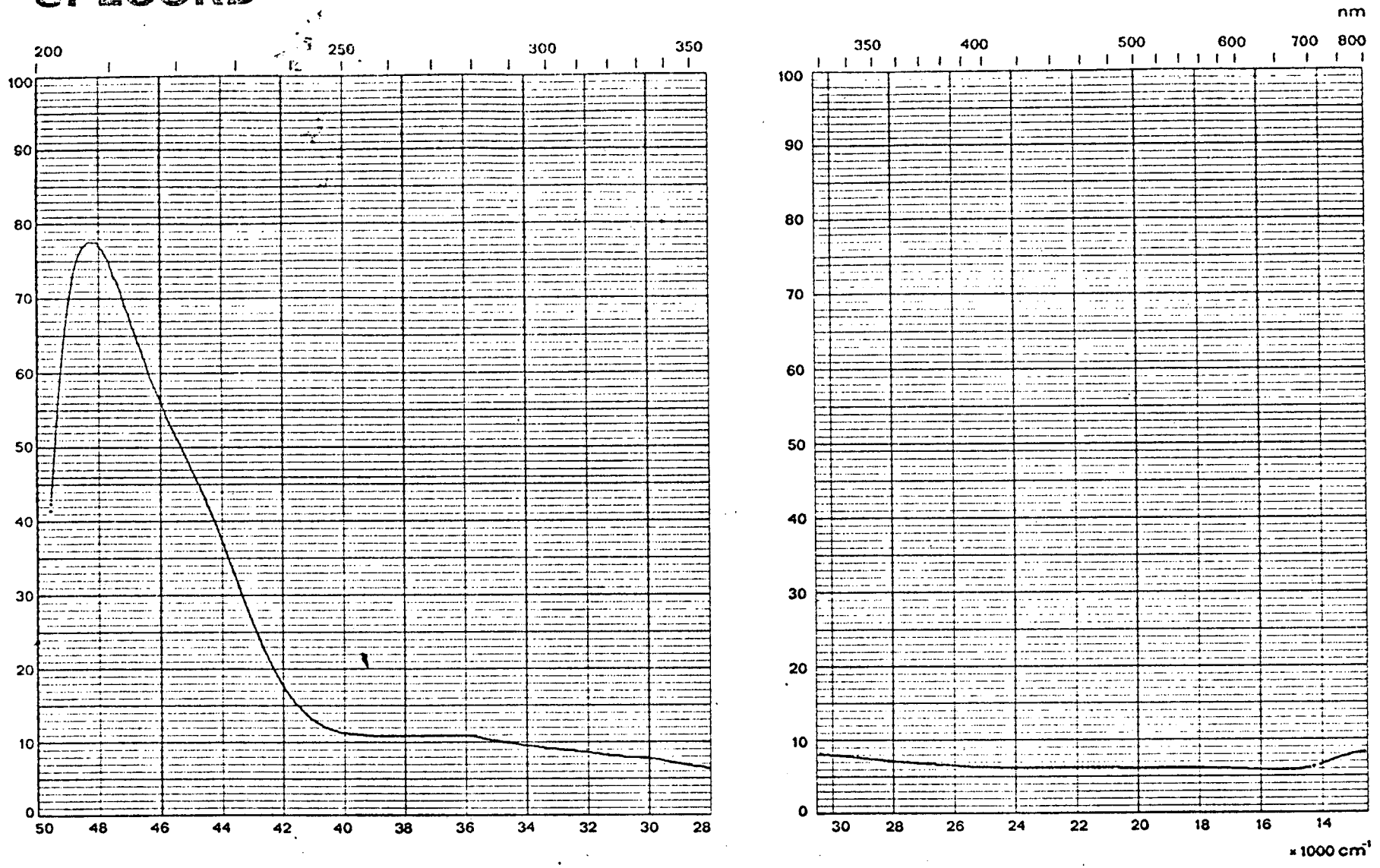
El espectro presenta una señal a205 nm característica de las saponinas insaturadas (Figura 11).

Espectro I.R.: (Figura 12) en Bromuro de potasio.

cm^{-1}	
3400	OH
2900	C-H
1667	$R_2C = CHR$
1039	OH
1070	OH

De acuerdo a las pruebas químicas efectuadas y al espectro I.R. se puede sospechar, que la saponina tiene una estructura esteroidal.

SPECORD



Probe Ext. EtOH. sap 35-40

Nr.

Datum.Name

Konzentration

Schichtdicke

Vergleichsprobe

FIGURA 11

Meßbereich

Maßstab

Registrierzeit

NO. 007-1493

PERKIN ELMER

CONCENTRATION

THICKNESS

PHASE Solido

REMARKS

SCAN MODE ACCY [ ] SUB-EXT [ ]

HI ENERGY [ ] CAL [ ]

RESOLUTION [ ]

OPERATOR J P. DATE 8 IX 82

SPECTRUM NO.

SAMPLE Ext-Et OH. Sap. 35-40

ORIGIN H.b.

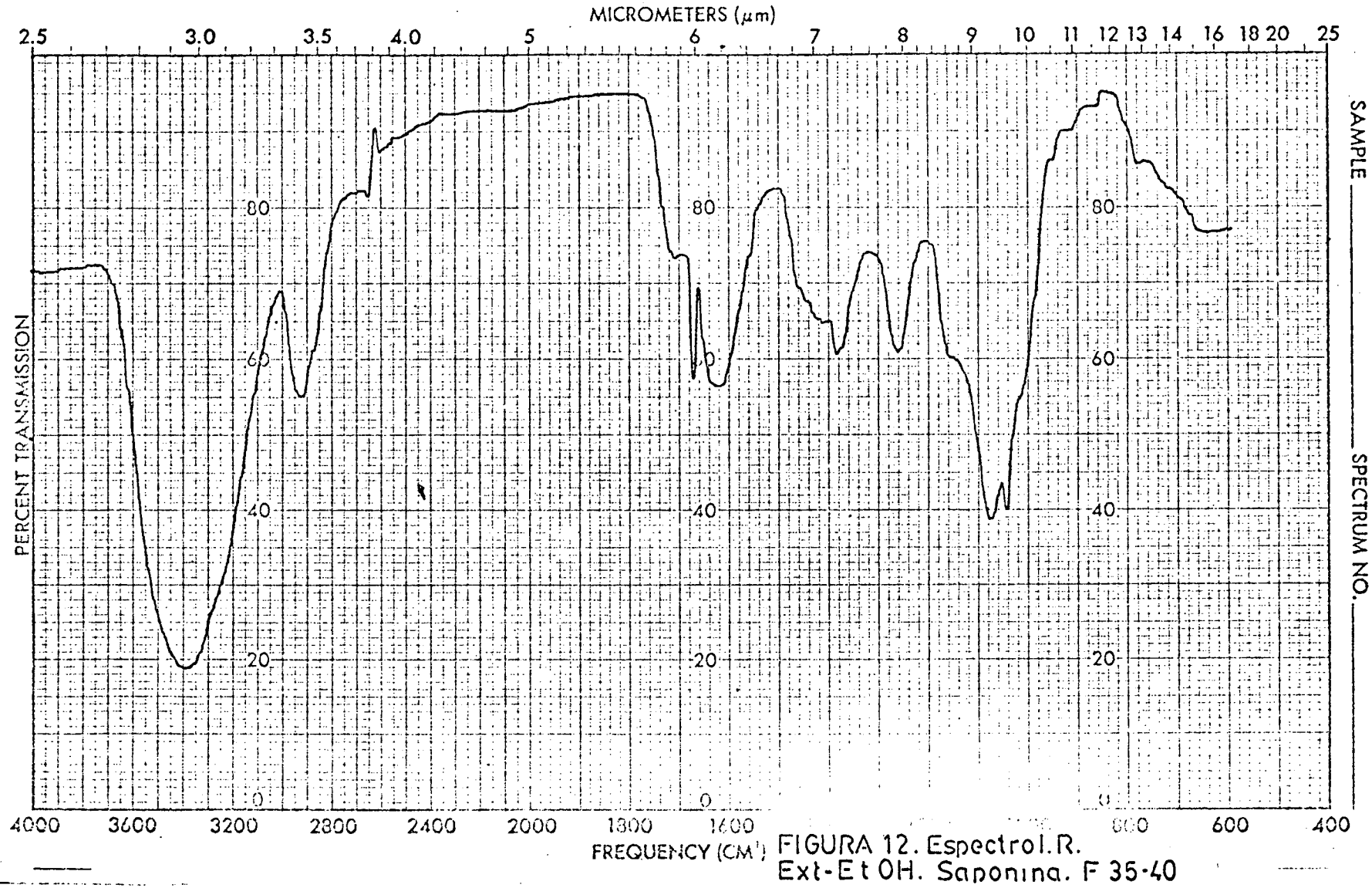


FIGURA 12. Espectrol.R.
Ext-Et OH. Saponina. F 35-40

De estos extractos (etanol-cloroformo) se aislaron sales de Nitrato de potasio y cloruro de potasio; presentaron las mismas características y propiedades químicas de las sales obtenidas del extracto acetato de etilo,

BIBLIOTECA AGRO... DE COL...

DISCUSION

Los resultados obtenidos permiten suponer que existen varias especies vegetales en determinadas regiones que están relacionadas con la Hematuria Vesical Bovina, hecho que está de acuerdo con lo sugerido en la literatura sobre el tema, pero no descarta otras posibles causas propuestas por otros investigadores (3, 20, 21, 23, 24).

Las zonas donde prosperan con mayor éxito las especies vegetales consideradas, se caracterizan por cambios meteorológicos contínuos, que determinan condiciones climatológicas variables; éstas, probablemente son las que permiten el desarrollo de una flora peculiar, la cual difícilmente progresaría en regiones donde no se presenten las mismas condiciones de humedad, precipitación pluvial, características y propiedades del suelo, niebla de ladera y la relación que guardan las especies entre sí. La acción mecánica de las lluvias frecuentes la mayor parte del año en estas zonas, dadas las características topográficas, sobre la vegetación y el suelo, podría significar la pérdida de microelementos indispensables en la dieta animal, que provocaría un estado carencial relacionado con la HVB (19, 28).

Los diferentes medios de reproducción de las especies (semillas, rizomas, estolones) favorecen su propagación en potreros destinados al pastoreo animal, haciendo difícil su eliminación por los métodos tradicionales,de estas plantas consideradas como malezas (6).

La presencia casi desapercibida de estos vegetales que crecen entre los pastos que normalmente consume el ganado (Pennisetum clandestinum n.v. kikuyo) permite su facil ingestion, sin que los bovinos tengan oportunidad de reconocerlos o evadirlos, caso contrario a lo que podría ocurrir con el helecho P. aquilinum. Es de anotar que dependiendo de las lluvias, suelo y otros factores, las mismas especies varíen sus metabolitos secundarios pudiendo o no estar presentes en determinadas épocas del año; los períodos de remisión de la HVB podrían coincidir con la ausencia de este tipo de plantas que varían y almacenan compuestos de acuerdo con las condiciones ambientales que se den durante las distintas épocas del año (2, 10).

Se ha informado que la alimentación de los bovinos, incluyendo pastos, musgos y presumiblemente otro tipo de vegetación, provocan una acción tóxica e irritante sobre la mucosa vesical; estas alteraciones responden a sustancias del tipo glicósido, ácidos, taninos, etc. que se han aislado del helecho Pteridium aquilinum. La presencia de éstas y otras sustancias identificadas

en el helecho, se evidenciaron en las pruebas químicas realizadas con las cuatro especies vegetales utilizadas en los ensayos biológicos (19, 22, 28).

La participación de las especies vegetales en el desarrollo de la Hematuria Vesical Bovina, se confirmó con los hallazgos anatomopatológicos, los cuales registraron la presencia de microhematuria en cada uno de los grupos a los que se suministró extracto vegetal.

La determinción previa de proteína en los ratones de la jaula No. 2 puede corresponder a una etapa aguda a nivel renal, como consecuencia de la dieta suministrada. La severidad de las lesiones microscópicas observadas es dependiente del tiempo durante el cual se suministre la dieta vegetal; lesiones más avanzadas son de esperarse en un tiempo mayor de experimentación, al alimentar los ratones con esta clase de extractos. MIcroscópicamente, la sangre observada en la luz de la vejiga urinaria, podría degenerar en síntomas relacionados estrechamente con la HVB.

De la especie Hydrocotyle bonplandii se aislaron saponinas (glicósidos) y sales; las primeras tienen acción irritante sobre el epitelio y provocan abundantes secreciones (2, 5, 10).

Los nitratos y nitritos entre otras sustancias, son considerados entre varios de los factores de influir en la localización e incidencia de lesiones neoplásicas además de inducir el aborto, retardo en el crecimiento y baja en la producción de leche en los bovinos (22, 25, 26).

La presencia de sustancias comunes en cuatro de las plantas, permite sospechar que existe un elemento tóxico determinante que actúa en forma directa o al ser modificado durante el metabolismo animal. Los mismos compuestos comunes al P. aquilinum podrían explicar las lesiones vesicales y el desarrollo de un adenoma intestinal en uno de los animales en experimentación.

La reproducción experimental de la enfermedad, se efectuó en ratones dado su metabolismo, tiempo de respuesta, facilidad de manejo y los resultados satisfactorios que se han obtenido al utilizar ratones en diversas investigaciones relacionadas con el tema.

Empíricamente se ha observado que animales jóvenes provenientes de otras regiones con características diferentes a las consideradas en zonas de HVB y que han completado su desarrollo en estas últimas, no llegan a presentar macrohematuria. Se puede suponer de cierta predisposición en aquellos bovinos que siempre completan su desarrollo en zonas de hematuria, donde han permanecido en determinadas condiciones consumiendo un tipo característico de ve-

getación.

Se han reportado fincas donde el helecho no está presente; sin embargo, el desarrollo de la HVB ha sido confirmado, se podría verificar la presencia y abundancia de las especies aqui consideradas que podrían estar relacionadas con HVB.

El valor de X^2 teórico igual a 23.629 es menor que el valor calculado que es igual a 54.333. Estos resultados permiten concluir que los valores de especies-estaciones, no son significativamente diferentes, por lo que hay dos posibilidades:

- Las muestras son realmente idénticas en las cinco estaciones.
- Las muestras son diferentes pero las fluctuaciones del azar esconden esta diferencia; es necesario aumentar el número y la precisión de los datos con el objeto de escoger entre las dos posibilidades o hacer los valores significativamente diferentes y buscar una explicación biológica a la distribución de las especies (1).

Es necesario seleccionar métodos químicos adecuados para evitar la propagación de estos vegetales y asi reducir, presumiblemente, en algún grado, la incidencia de la HVB.

Si bien los resultados de la investigación no son del todo concluyentes, sí permiten concentrar los esfuerzos inmediatos a las cuatro especies vegetales consideradas.

CONCLUSIONES

1. Se identificaron algunas especies vegetales características de aquellas zonas en donde generalmente se darrolla la Hematuria Vesical Bovina.

2. Los ratones utilizados en el experimento a los cuales se suministró extractos acuosos de las especies H. bonplandii, C. racemosa, T. rudis y T. peruvianum, presentaron lesiones histopatológicas similares a las descritas en casos de Hematuria Vesical Bovina.

3. Mediante las pruebas químicas realizadas con las cuatro especies vegetales, se comprobó la presencia de sustancias comunes, que se han aislado del helecho P. aquilinum, considerado como uno de los principales factores en la etiología de la Hematuria Vesical Bovina.

4. De la especie H. bonplandii se aislaron saponinas y sales de nitrato y cloruro de potasio, compuestos que pueden causar lesiones relacionadas con la HVB.

5. Las propiedades de diferentes sustancias químicas presentes en las especies H. bonplandii, C. racemosa T. rudis y T. peruvianum, pueden tener relación con el desarrollo

de la Hematuria Vesical Bovina.

BIBLIOGRAFIA

1. ALIAIN, J. Unos coeficientes y tests de mucha utilización en Ecología. Ministerio de Defensa Nacional. Armada Nacional. Escuela Naval de Colombia. Departamento de Ciencias del Mar. Cartagena, Colombia. 1975. 26 p.

2. BASU, N.; RASTOGI, R. P. Triterpenoid saponins and sapogenins. Phytochemestry. v. 6, p. 1249-1270. 1967

3. BERAN, G. W. Bovine cystic hematuria in the Philipinas: A report on an enzootic area. Journal American Veterinary Medical Association. v. 149, p. 1686-1680. 1966

4. BROBST, D. F.; OLSON, C. Histopathology of urinary bladder tumor induced by bovine cutaneous papiloma agent. Cancer Research. v. 25, p. 12-19. 1965

5. CALDERON, G. E. Guía para el análisis de plantas y notas prácticas sobre fitoquímica. Universidad Nacional de Colombia. 1963. 169 p.

6. CARDENAS, J.; REYES, C.; DOLI, J. Malezas tropicales. Ed. Fernando Pardo, ICA, Bogotá. 1972. 341 p.

7. CLAUS, E.; TYLER, V. Farmacognosia. Ed. El Ateneo, Buenos Aires. 1965.533 p.

8. DE MUELENAERE, H. J. H. Toxicity and haemagglutinating activity of legumes. Nature. v. 206, p. 817-828. 1965

9. DOCUMENTA GEIGY. Tablas científicas. Séptima edición. Ed. Ciba Geigy S. A., Ba-silea, Suiza. 1975. 819 p.

10. DOMINGUEZ, X. A. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa, México. 1973. 281 p.

11. DUKES, H. H. Fisiología de los animales domésticos. Segunda edición, Ed. Aguilar, Madrid. 962. p.

12. EVANS, A. J.; MASON, J. Carcinogenic activity of bracken. Nature. v. 208, p. 913-914. 1965

13. GARCIA, B. H. Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1974. 538 p.

14. GOLA, A.; NEGRI, G.; CAPPELIETI. Tratado de botánica. Ed. Labor, Barcelona. 1961.1160 p.

15. GUTIERREZ, R. E. Química inorgánica. Ed. Reverte S. A. España. 1978. 875 p.

16. INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES. Museo de historia natural. Universidad Nacional de Colombia. Notas divulgativas, 7. Bogotá. 29 1977. p.

17. KERSHAW, K. A. Quantitative and dynamic plant ecology. Second ed. Ed. Edward Arnold, London. 1975. 308 p.

18. LINDNER, E. Toxicología de los alimentos. Ed. Acribia, España. 1978. 138 p.

19. LUQUE, G. La cistitis crónica hemorrágica o hematuria esencial de los bovinos. Revistas ACOVEZ. v. 1 no. 3, p. 17-26. 1977

20. McKENZIE, R. A. Bovine enzootic haematuria in Queensland. Australian Veterinary Journal. v. 54, p. 61-64. 1978

21. OLSON, C. Enzootic hematuria and papillomatosis of food animals. Departament of Veterinary Science. University of Wisconsin, Madison. 1982. 2 p.

22. PAMUKCU, A. M.; PRICE, J. M.; BRYAN, G. Assay of fractions of bracken fern (Ptris aquilina) for carcinogenic activity. Cancer Research. v. 30, p. 902-905. 1970

23. _____.; OLSON, C.; PRICE, J. M. Assayf of fractions of urine for carcinogenic activity after feeding bracken fern (Pteris aquilina). Cancer Research. v. 26, p. 1745-1753. 1966

24. _____.; GOKSOY, S. L.; PRICE, J. M. Urinary bladder neoplasms induced by feeding bracken fern (Pteris aquilina) to cows. Cancer Research. v. 27, p. 917-924. 1967

25. PEÑA, N. E.; PEÑA, F.; GUTIERREZ, L. Niveles de nitratos y nitritos en aguas gramíneas y malezas predominantes en una zona del piedemonte llanero. Revista ACOVEZ. v. 1 no. 2, p. 22-25. 1977

26. RADALEFF, R. D. Toxicología veterinaria. Ed. Academia, León España. 1967. 378 p.

27. VILLAFAÑE, A.; LICHTENBERGER, E. Hematuria vesical bovina (HVB) en Colombia. Revista ACOVEZ. v. 3 no. 11, p. 9-13. 1979

28. VILLAFAÑE, A.; LICHTENBERGER, E.; SANCHEZ, O.; RAVE, G.; PEREZ, A. Hematuria vesical bovina (HVB) en Colombia. Revista ACOVEZ. v. 3 no. 12, p. 7-11. 1979

29. _____.; _____.; OSPINA, J.; BAEZ, E. La hematuria vesical bovina (HVB) en Colombia. Revista ACOVEZ. v. 4 no. 13, p. 19-25. 1980

30. YOSHIKAWA, T.; OYAMADA, T. Histopathology of papillary tumor in the bovine urinary bladder. Jap. Journal Veterinary Science. v. 37, p. 227-287. 1975

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA