

## ACTIVIDAD DIURÉTICA DEL EXTRACTO TOTAL ACUOSO DE LOS CÁLCICES DE *Hibiscus sabdariffa* L. ADMINISTRADO EN RATAS ALBINAS VARIEDAD WISTAR

### RESUMEN

La fracción en etanol del extracto liofilizado y el Extracto total acuoso sin liofilizar (infusión) de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* fueron los tratamiento que presento mayor efecto diurético, en ratas albinas machos cepa *wistar* de peso promedio 295,1g; cuando se evaluaron concentraciones de 20 mg/kg de peso corporal comparados con el control positivo hidroclorotiazida respectivamente. L3 presenta una diuresis de tipo no electrolítico de acuerdo a lo establecido por Stein, con comportamiento fisiológico diferente al del patrón positivo Hidroclorotiazida. El extracto total acuoso liofilizado en dosis de 400 mg/Kg de peso corporal no induce alteraciones macromorfológicas y tampoco histopatológicas al ser administrado en ratas albinas machos cepa *wistar*.

**PALABRAS CLAVES:** *Hibiscus sabdariffa*, liofilizado, *wistar*, histopatológicas, Hidroclorotiazida.

### ABSTRACT

*Ethanollic fraction of liofilized extract and the total not liofilized aqueous extract (infusion) of calices of Hibiscus sabdariffa were th treatments that presented higher diuretic effect in male albine rats, cepa wistar, with average weight 295.1 g, when evaluated at concentration of \*\*20 mg/kg of corporal weight compared with the positive control hydrochlorotiazide respectively. L3 presents a diuresis of non electrolytic type according to that established by Stein, with physiological behaviour different to that of positive patron hydrochlorotiazide. The total liofilized aqueous extract at 400 mg/kg of corporal weight dose do not induce either macro-morphological nor histopathological alterations when administered in male albine rats, cepa wistar.*

**KEYWORDS:** *Hibiscus sabdariffa*, liofilized, *Wistar*, histopathological, hydrochlorotiazide

### 1. INTRODUCCIÓN

En el Departamento de Sucre existen condiciones que favorecen la utilización de plantas medicinales. Precisamente por su escaso desarrollo económico y la disponibilidad del material vegetal, es común ver a personas utilizando y recomendando una gran cantidad de hierbas o brebajes para curar diferentes males que van desde cefalea, fiebres y tos hasta hipertensión y cáncer. En este sentido podemos señalar que el boldo o flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es una planta silvestre o cultivada en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, familia de las Malvaceae, aprovechada por su fibra, usos alimenticios y medicinales, de cuyos cálices y a través de infusión se obtiene una bebida, refrescante, ligeramente acidulada, recomendada popularmente como emoliente diurético, espasmolítico, antihelmíntico, antibacteriano, antihipertensivo y antiescorbútico, [1];[2].

Efectos farmacológicos de extractos de este vegetal fueron estudiados demostrando propiedades como la

### RITA LUZ MARQUEZ VIZCAINO

Químico farmacéutico, Ms.C  
Profesora Asistente  
Universidad de Sucre.  
fitorita@yahoo.es

### CATALINO DE LA ROSA TORRES

Químico farmacéutico, Ms.C  
Profesor Titular  
Universidad del Atlántico  
cdelarosa@uniatlantico.edu.co  
catalinod@yahoo.com

### CESAR AGUSTO RIVERO

Universidad de Sucre, Departamento de Biología. Facultad de Educación y Ciencias, Sincelejo –Colombia

### MILTON MEDINA MONTES

Universidad de Sucre, Departamento de Biología. Facultad de Educación y Ciencias, Sincelejo –Colombia

antihipertensiva, reportado por Onyenekwe y colaboradores [3], quienes además encontraron un leve aumento en la eliminación de orina en las ratas tratadas; sin embargo la actividad diurética aunque podría explicar parcialmente la actividad hipotensiva, ha sido poco estudiada. Por tal razón el estudio del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L permite reconocer la potencialidad de la flora de nuestra región al evaluar su actividad diurética en ratas albinas variedad *Wistar*.

Los cálices de esta planta son ricos en compuestos fenólicos con una marcada actividad fisiológica [4]; y su DL<sub>50</sub> ha sido calculada en 5000 mg/Kg para el extracto acuoso, pero el consumo continuo en dosis 1000 mg/Kg provoca una muerte súbita en ratas hipertensas [3].

El extracto acuoso de las flores de la planta inhibe la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y previene varios tipos de hiperlipidemias en ratas con una dieta alta en fructosa y colesterol; además este extracto

reduce los triglicéridos en suero de ratas con una dieta alta en fructosa [5].

Las antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L (HAs), presentes en las flores, y en concentraciones de 0.10 ó 0.20 mg/mL presentan una considerable función antioxidante; también in vivo, un pretratamiento de HAs (100 y 200 mg/Kg) por 5 días antes de una dosis única de t-BHP (tert-butilhidroperóxido - 0.2 mmol/Kg) decrece significativamente los niveles alanina y aspartato aminotransferasas y reduce daño hepático por oxidación; la evaluación histopatológica muestra que estos pigmentos de *Hibiscus sabdariffa* L reducen la incidencia de lesiones en hígado, incluyendo inflamación, infiltración leucocitaria y necrosis inducida por t-BHP en ratas [6]. Otros ensayos muestran que las HAs pueden ser usadas para disminuir la hepatotoxicidad inducida por paracetamol [7].

Cuando existe una producción excesiva de orina en los riñones junto con una excreción urinaria, bien sea natural o inducida, estamos hablando de diuresis. Quienes aumentan la salida o excreción urinaria de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y agua son denominados diuréticos, utilizados en el tratamiento de muchas condiciones patológicas y de los que existen varias clases o tipos dependiendo del sitio de la nefrona donde actúe impidiendo la reabsorción tubular de  $\text{Na}^+$  y agua. Diuréticos proximales, los que bloquean la anhidrasa carbónica; diuréticos de asa, que actúan en la rama ascendente del asa de Henle; diuréticos tipo tiazidas o dístales, que actúan en el túbulo distal y en el segmento conector (y posiblemente en la porción temprana del túbulo colector cortical); los diuréticos ahorradores de potasio (antikaliurético), actúan en el túbulo distal y colector cortical y en células sensibles a la aldosterona. Los nuevos diuréticos aumentan la excreción de agua al bloquear la acción de la hormona antidiurética en los receptores V2 del túbulo colector cortical [8].

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Recolección y tratamiento del material vegetal.

Los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L, libres de semillas, provenientes de plantas adultas en época de fructificación durante el mes de abril, obtenidos de cultivos en la finca Manara localizada en la zona noroccidental del municipio de Sincelejo, departamento de Sucre, en el corregimiento de La Arena, con 125 msnm; fueron secados en secador solar a una temperatura media de 55° C. El material así obtenido fue molido para facilitar la extracción.

**2.2 Obtención de los extractos.** El extracto total acuoso fue obtenido a partir de 200 gramos de material vegetal y sometido a reflujo durante 3 horas. Este extracto fue filtrado y liofilizado en los laboratorios de productos naturales y farmacognósticos de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Cartagena.

El liofilizado es sometido a cromatografía flash en fase reversa con etanol, para lo cual se tomaron 25 g del liofilizado y 250 g de RP18. Esta fracción fue concentrada a presión reducida en un rotaevaporador para eliminar el exceso de solvente de la muestra, obteniéndose un extracto viscoso color rojo oscuro.

### 2.3 Identificación Cualitativa de Metabolitos Secundarios

A partir del extracto total acuoso y luego de su liofilización se realizó el tamizaje fitoquímico preliminar para detectar la presencia de metabolitos secundarios mayoritarios, basado en el método descrito en las notas de Farmacognosia y Fitoquímica Experimental del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia por Alejandro Martínez[9]. Este screening fitoquímico se realizó basado en reacciones de precipitación o coloración; que contó con pruebas para: flavonoides, leucoantocianinas, saponinas, taninos, terpenos, quinonas, alcaloides, aminoácidos y compuestos fenólicos.

### 2.4 Evaluación de Actividad Diurética.

La actividad diurética del extracto total liofilizado y fracciones separadas se ensayó utilizando en total 24 ratas albinas macho, cepa *Wistar*, suministradas por el bioterio de la Pontificia Universidad Javeriana, de 9 semanas de nacidas, con un peso comprendido entre 240 y 340 gramos.

**2.5 Preparación de los tratamientos:** La solución blanco agua destilada; y los patrones positivos furosemida e hidroclorotiazida, cada una de las cuales se administró a una concentración de 20 mg/kg de peso. Para obtener éstas soluciones de furosemida e hidroclorotiazida fue necesario extraer el principio activo de capsulas tipo comercial (MK) con etanol analítico.

El extracto total liofilizado y la fracción etanólica se administraron a una concentración de 20 y 200 mg/kg cada uno; mientras que el extracto total acuoso obtenido por infusión durante 10 minutos se administró en dosis única de 20 g/kg; y el extracto total acuoso liofilizado destinado a la evaluación del daño histopatológico a 400 mg/kg.

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

Tratamiento blanco – agua destilada (B), Patrón positivo furosamida (F), Patrón positivo hidroclorotiazida (H), Extracto total acuoso liofilizado 20 mg/kg (L1), Extracto total acuoso liofilizado 200 mg/kg (L2), Fracción en etanol del liofilizado 20 mg/kg (L3), Fracción en etanol del liofilizado 200 mg/kg (L4), Extracto total acuoso sin liofilizar (infusión) 20 g/kg (L5), Extracto total acuoso liofilizado 400 mg/kg (DH); cada uno de los cuales se realizó por cuadruplicado; a excepción del tratamiento destinado a la evaluación de daño histopatológico, que

contó con una duración de 8 días en donde se administraban 2 mL de extracto total acuoso liofilizado disuelto en agua destilada a una concentración de 400 mg/kg de peso corporal a dos ratas.

La distribución de las ratas se realizó por medio de bloques completamente al azar, en donde se forman grupos de individuos con pesos promedios, bajo las mismas condiciones, donde a cada uno se le administra un tratamiento diferente. A todos los animales se les suspendió la alimentación 12 horas antes y durante el tratamiento, mientras que la hidratación fue *ad libitum*.

En todos los casos los tratamientos fueron administrados por vía oral a través de sondas orogástricas y con un volumen de 2 mL de solución. Para llegar a este volumen y a la concentración requerida, se calculó el contenido mediante la fórmula:

$$\text{Contenido} = \text{peso promedio (g)} \times \text{concentración (mg/kg)} \times 10^{-3} \text{ kg}$$

Luego de aplicar los tratamientos, los animales de experimentación se llevaron en forma individual a jaulas metabólicas para colectar la orina.

La medición del volumen de orina y su pH se realizó cada dos horas hasta un total de 6 horas [8].

## 2.6 Determinación de pH y otros parámetros.

Las muestras de orina de los diferentes tratamientos se les midió el pH mediante cinta analítica "Universal-Indikatorpapier pH 1-14" (Mancherey-Nagel) sumergiéndola en la muestra y comparada con una escala de colores que comprendía un pH de 1 a 14.

Para la medición de los parámetros de las muestras de orina provenientes de las ratas tratadas con una dosis de 400 mg/kg, destinadas a la evaluación de daño histopatológico, se utilizaron cintas indicadoras "Multistix® 10 SG" (BAYER) basadas en cambios de coloración en tiempo establecido por el fabricante.

## 2.7 Determinación de los niveles de electrolitos, Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, en las muestras de orina colectadas

Se utilizó el espectrofotómetro de absorción y emisión atómica de llama Shimadzu AA-640-13. Se midió la potencia emitida para determinar la concentración de los electrolitos con un flujo de acetileno de 2 L/min, ángulo de 15°, potencia emitida de 0.092 y una longitud de onda de 589 nm para el sodio; y ángulo de 10°, potencia emitida de 0.055 y longitud de onda de 766.5nm para el potasio.

En la determinación de los niveles de sodio y potasio las muestras de orina se diluyeron en agua desionizada, y se prepararon soluciones patrones de 0.4 y 0.6 ppm respectivamente con diluciones de 1/1000 en ambos casos.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSION

Los ensayos de caracterización cualitativa realizados al extracto de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* indican la presencia de, flavonoides, aminoácidos, compuestos fenólicos y antocianinas, lo cual esta de acuerdo con la literatura, como lo reportado por Palé, et. al.; [11] CHRISTIAN, K.R. et. al 2006[12] y DE-XING HOU. Et. al. 2005[13].

Los resultados de la evaluación diurética del extracto etanólico total y fracciones, volumen de orina eliminado, pH y concentraciones de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> se muestran en la tabla. Estos resultados se obtuvieron mediante mediciones cada 2 horas hasta un total de 6 horas.

Tratamiento	Volumen en mL	pH	[ ] en ppm Na <sup>+</sup>	[ ] en ppm K <sup>+</sup>
L <sub>1</sub>	4,79	8,00	1,77	12,50
L <sub>2</sub>	3,38	7,79	2,80	10,35
L <sub>3</sub>	9,25	7,75	0,21	2,77
L <sub>4</sub>	4,42	7,67	0,83	7,53
L <sub>5</sub>	7,84	7,46	0,76	7,43
F	4,8	7,48	0,89	10,10
H	8,94	7,32	2,42	12,35
B	3,9	7,03	1,48	8,09

Tabla 1. Promedio del Volumen total de orina eliminada, pH y Concentración de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> a la sexta (6<sup>a</sup>) hora en todos los tratamientos.

En la tabla se observa una diferencia marcada de los volúmenes eliminados de orina al aplicar los tratamientos L<sub>3</sub>, L<sub>5</sub> y H con respecto a los demás, con lo que se muestra que el tratamiento que presento mayor efecto diurético, según el concepto de Goodman Gilman, fue L<sub>3</sub> y L<sub>5</sub> comparados con los controles positivos Hidroclorotiazida y furosamida.

Es importante anotar que los tratamientos L<sub>3</sub> y L<sub>5</sub> tienen un comportamiento similar al control positivo hidroclorotiazida en la eliminación del volumen de orina en los individuos analizados, resaltando que L<sub>3</sub> fue el que mejor comportamiento mostró con relación al efecto diurético, ya que mostró mejor respuesta incluso que la hidroclorotiazida. (Fig. 1)

Los análisis de varianza seguido del test de las diferencias significativas de Tukey's, y Fischer de las muestra de orina en la determinación de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup>, se obtiene que L<sub>3</sub> presenta menor eliminación de estos electrolitos comparado con los demás tratamientos, esto nos indica que L<sub>3</sub> presenta una diuresis de tipo no electrolítico de acuerdo a lo establecido por Stein, con comportamiento fisiológico diferente al del patrón positivo H. (Fig. 2)

Para los tratamientos L1 y L2 la concentración de los iones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la orina eliminada fue mayor,

seguido del B. Por lo que se interpreta que estos tratamientos presentan mayor diuresis de tipo electrolítica similar, o parecida a la manifestada por el control positivo furosamida.

**Estudio histopatológico:** Los cortes muestran con la coloración de Hematoxilina y Eosina, células con citoplasma, eosinófilos, correspondientes a hepatocitos con características usuales, y de aspecto morfológico dentro de los patrones de normalidad.

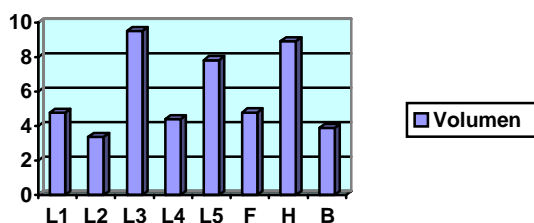


Figura 1. Volumen total de orina eliminada

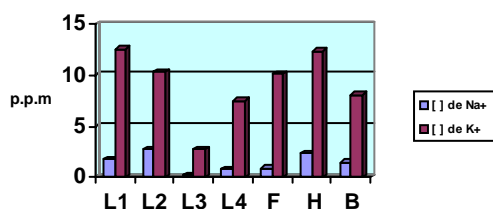


Figura 2. Promedio de las Concentraciones de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> de la orina recolectada en los diferentes tratamientos

No se encuentra infiltrado inflamatorio de la línea aguda crónica. Los vasos sanguíneos se observan de aspecto usual. No se observa necrosis celular por infiltrado inflamatorio como lo reporta Akindahusi & Olaley, 2003[14]; y Ali et. al, 2003[7]; debido, probablemente, a la actividad antioxidante de las antocianinas presentes en los cálices.

#### 4. CONCLUSIONES

El tratamiento (L3) mostró un efecto diurético. Ya que la dosis 20mg/Kg de este extracto obtenido en etanol (L3) suministrada en ratas *wistar* macho de peso aproximado 295,1g presenta mejor respuesta incluso que la Hidroclorotiazida en las condiciones ensayadas.

Los análisis de varianza seguido del test de las diferencias significativas de Tukey's, y Fischer en la determinación de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, de las muestras de orina analizadas se obtiene que L3 presenta menor eliminación de estos electrolitos comparado con los demás tratamientos, esto nos indica que L3 presenta una diuresis de tipo no electrolítico de acuerdo a lo establecido por

Stein, con comportamiento fisiológico diferente al del patrón positivo hidroclorotiazida en las condiciones ensayadas

#### 5. AGRADECIMIENTOS

**Dr. Rubén Darío Torrenegra.** Director del grupo de Investigación Fitoquímica Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración en el desarrollo de la Actividad biológica.

**Tulio Anaya Armas.** Profesor Facultad de Educación y Ciencias Universidad de Sucre, por su asesoría en el análisis estadístico.

**Dr. Jairo Bustillo.** Profesor Facultad de Odontología Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración en el análisis histopatológica.

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] MUÑOZ, Alberto. Salud con Plantas Medicinales, Su utilización práctica. ECOE ediciones. Santa Fé de Bogotá. 1994
- [2] MORTON, J. Roselle. In: fruits of warm climates. p. 281-286. Miami, Florida.1987
- [3] ONYENEKWE, PC; AJANI, EO, AMEH, DA & GAMANIEL KS. Antihypertensive Effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) Calyx Infusion in Spontaneously Hypertensive Rats and a Comparison of its Toxicity with That in Wistar Rats. [Abstract]. PMID : 0451541 [PubMed – indexed for MEDLINE]. Cell Biochem Funt Sep; 17(3):199-206. 1999
- [4] OLATUNDE FAROMBI, E. African Indigenous Plants with Chemotherapeutic Potentials and Biotechnological Approach to the Production of Bioactive Prophylactic Agents [Review]. African Journal of Biotechnology Vol. 2 (12), pp. 662-671. diciembre de 2003. Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>
- [5] CHANG-CHE, Chen; FEN-PI, Chou; YUNG-CHYAN, Ho; WEA-LUNG, Lin; CHIN-PIN, Wang; ERI-SHYT, Kao; AN-CHUNG, Huang & CHAU-JONG, Wang. Inhibitory Effects of *Hibiscus sabdariffa* L Extract on Low-density Lipoprotein Oxidation and Anti-hyperlipidemia in Fructose-fed and Cholesterol-fed Rats. [Abstract]. Journal of Science of Food and Agriculture. Society of Chemical Industry. 21-05-2004.
- [6] WANG, CJ; WANG, JM; LIN, WL; CHU, CY; CHOU, FP & TSENG, TH. Protective Effect of *Hibiscus Anthocyanins* Against tert-Butyl

Hydroperoxide-Induced Hepatic Toxicity in Rats. [Abstract]. PMID: 10762726 [PubMed – indexed for MEDLINE]. Food Chem Toxicol. May; 38(5): 411-416. 2000.

[7] ALI, BH; MOUSA, HM & EL-MOUGY, S. The Effect of a Water Extract and Anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L on Paracetamol-induced Hepatotoxicity in Rats. [Abstract]. PMID: 12557248 [PubMed – indexed for MEDLINE]. Phytother Res. Jan; 17(1):56-59. 2003.

[8] Diuréticos y tratamiento del edema. En : <http://www.drscope.com/privados/pac/generales/desequilibrio/diuretico.htm>.

[9] MARTINEZ, Alejandro. Farmacognosia y Fitoquímica Experimental. Universidad de Antioquia. Medellín. Octubre de 1991

[10] CACERES A, 1996. Plantas de uso Medicinal en Guatemala. Edición 1ª. Universitaria. Vol.1. P 46, 317.

[11] ÉLOI PALE, MARIE KOUDA-BONAFOS, MOUHOSSINE NACRO. Caractérisation et mesure des activités anti-radicalaires d'anthocyanes de plantes du Burkina Faso. C. R. Chimie 7 (2004) 973–980. abril de 2004

[12] CHRISTIAN, K.R. NAIR, M.G. JACKSON, J.C. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). Journal of Food Composition and Analysis. Abril 2006.

[13] DE-XING HOU , XUHUI TONG, NORIHIKO TERAHARA, DONG LUO, MAKOTO FUJII. Delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. Archives of Biochemistry and Biophysics 440 (2005) 101–109. 22 de junio 2005.

[14] AKINDAHUSI, AA & OLALEYE, MT. Toxicological Investigation of Aqueous-Methanolic Extract of the Calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. [Abstract]. PMID: 14522449 [PubMed – indexed for MEDLINE]. J Ethnopharmacol. Nov; 89(1): 161-164. 2003