

Boletín del
Colegio Mexicano de Urología

Volumen
Volume 17

Número
Number 3

Julio-Septiembre
July-September 2002

Artículo:

Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario

Derechos reservados, Copyright © 2002:
Colegio Mexicano de Urología, A.C.

Otras secciones de
este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com



Efecto de isoflavonas aisladas de la corteza de *Eysenhardtia polystachya* sobre el crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio urinario

Rosa Martha Pérez Gutiérrez,* Rosario Vargas Solís,** Luz María García Dueñas,*
Lilia Dávila Badillo*

* Laboratorio de Investigación de Productos Naturales. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. IPN.

** Laboratorio de Investigación de Fito-farmacología. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Correspondencia:
Rosa Martha Pérez Gutiérrez
Punto Fijo 16, Col. Torres Lindavista
C.P. 07708, México, D.F.
Tel: 5752-9349
Fax: 011 (525) 752-9349
E-mail: dmex@dfi.telmex.net.mx

RESUMEN

Las isoflavonas aisladas de la madera de *Eysenhardtia polystachya*: 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavona [A] y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona [B] muestran una significante protección dosis-dependiente contra la urolitiasis inducida por la implantación de discos de zinc en ratas. **Objetivos:** 1) Evaluar estas isoflavonas en la formación de cálculos de oxalato y fosfato de calcio en orina normal, con historial de producción de cálculos renales (anormal) y orina artificial. 2) Evaluar el efecto sobre la cristalización de oxalato de calcio (COM) a condiciones de supersaturación constante. **Material y métodos:** La actividad de la orina normal se midió usando la técnica de nefelometría la cual se comparó con la orina anormal y artificial teniendo idénticas concentraciones de isoflavonas. La actividad inhibitoria de la formación de cristales de oxalato de calcio se determinó a condiciones de supersaturación constante en presencia de las isoflavonas como una función de supersaturación relativa con respecto a COM. **Resultados:** La reducción de concentración de oxalato en orinas normal, anormal y artificial tratadas con el compuesto [A] fue de 64.23, 38.6 y 22.43% respectivamente. Con el compuesto [B] la reducción fue de 55.95, 18.62 y 20.32% respectivamente. Con la adición de fosfato la reducción de la turbidez en las orinas normal, anormal y artificial con el compuesto [A] fue de 70.31, 44.57 y 38.61% respectivamente, en cambio con la adición de la isoflavona [B] fue de 63.8, 40.61 y 30.16% respectivamente. Los compuestos [A] y [B] a una concentración de 4.6×10^{-4} M producen una considerable disminución en la velocidad de crecimiento y nucleación de los cristales de oxalato de 89 y 72% respectivamente. **Conclusiones:** Las isoflavonas aisladas de *E. polystachya* actúan como inhibidores en la formación y crecimiento de cristales de oxalato y fosfato de calcio reduciendo el grado de agregación y el tamaño de la partícula precipitada, por lo que pueden ser recomendados como medicina preventiva en pacientes que presenten formación de piedras renales.

Palabras clave: Oxalato de calcio, fosfato de calcio, *Eysenhardtia polystachya*: 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavona y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona.

ABSTRACT

The isoflavones isolated from heartwood of *Eysenhardtia polystachya*: 7-hydroxy-2', 4', 5'-trimethoxyisoflavone [A] y 7-hydroxy-4'-ethoxyisoflavone [B] showed significant dose dependent protection against urolithiasis induced by zinc disc implantation in albino rats. **Objective:** 1) Evaluated the ability of isoflavones to inhibit calcium oxalate and calcium phosphate in normal, of adults with history of urinary stones (abnormal) and artificial urines. 2) Evaluated the effect of isoflavones on the crystallization of calcium oxalate (COM) at conditions of constant supersaturation. **Material and methods:** The activity of normal urine was measured (nephelometric procedure) and compared with that of artificial urines and abnormal urine having identical concentrations of the isoflavones. The inhibitory activity of COM crystal growth in the presence of the isoflavones were measured at conditions of constant solution supersaturation as function of relative supersaturation with respect to COM. **Results:** The change of oxalate concentration in urines normal, abnormal and artificial treated with isoflavone [A] was reduced in 64.23, 38.6 y 22.43% respectively. When the compound [B] was added reduced in 55.95, 18.62 y 20.32% respectively. The activity of compounds [A] on the formation of phosphate for normal abnormal and artificial urines were of 70.31, 44.57 y 38.61% respectively. With the added of compound [B] were reduced in 63.8, 40.61 y 30.16% respectively. The compounds [A] and [B] produced significant lowering growth rate and nucleation rate of calcium oxalate crystals at concentration of 4.6×10^{-4} M exerted a maximum response of 89% and 72% reduction respectively. **Conclusions:** The isolated isoflavones [A] and [B] from *E. polystachya* work as inhibitors in the formation and crystal growth of COM and phosphate and may protect against stone formation by reducing the degree of aggregation and the size of particles precipitated. These compounds can be recommended as a preventive medicine in renal stone formation.

Key words: Calcium oxalate, calcium phosphate, *Eysenhardtia polystachya*, 7-hydroxy-2', 4', 5'-trimethoxyisoflavone, 7-hydroxy-4'-ethoxyisoflavone.

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocido que la orina normal contiene sustancias tales como el ácido cítrico, ácido isocítrico,² pirofosfato,³ magnesio,⁴ ácido mucopolisacárido,⁵ urea y creatinina que inhiben la formación de oxalato y fosfato de calcio.¹ Estas sustancias afectan la formación de cálculos renales actuando de la siguiente manera: El ácido cítrico y ácido isocítrico⁶ forman complejos estables con el calcio reduciendo así la velocidad de la reacción. El pirofosfato es absorbido sobre ciertas partes del cristal evitando así posteriores depósitos sobre éste. El magnesio es el principal contribuyente de la fuerza iónica de la orina, inhibiendo la formación de oxalato y fosfato de calcio. La urea y la creatinina son los principales componentes de la orina, incrementando la solubilidad del fosfato de calcio.⁶

El árbol *Eysenhardtia polystachya* conocida comúnmente como "palo azul" pertenece a la familia de las Leguminosae. Esta planta es utilizada en la medicina tra-

dicional en el tratamiento de urolitiasis y una gran variedad de enfermedades urinarias, para este propósito la madera es hervida con agua para producir un líquido de color dorado, con una fluorescencia azul de la cual los enfermos se toman una taza diariamente. En investigaciones anteriores se demostró la propiedad antiurolitiásica del extracto acuoso de esta planta en animales de experimentación.⁷ Así como también el aislamiento e identificación de los constituyentes fenólicos de la *E. polystachya* (7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavona y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavona) con actividad antiurolitiásica y diurética.⁸ En esta investigación se obtuvieron evidencias de que estas isoflavonas, presentan actividad inhibitoria en el crecimiento de los cristales de oxalato y fosfato de calcio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de las isoflavonas
A partir del extracto de metanol de la madera de *Eysenhardtia polystachya* se aislaron las isoflavonas 7-hidroxi-

2', 4', 5'-trimetoxiisoflava [A] y 7-hidroxi-4' etoxiisoflava [B]. Las estructuras de estos compuestos se determinaron por medio de los datos espectroscópicos obtenidos del análisis de IR, RMNH¹, RMN¹³C y E.M⁸.

Actividad inhibitoria en orinas normal, anormal y artificial

Las orinas normales estudiadas, se tomaron diariamente en la mañana antes del desayuno a partir de 6 adultos (25-40 años) sanos de ambos sexos que no presentaran antecedentes de enfermedades en el tracto urinario. No se adicionó ningún tipo de preservativo. Todas las orinas se empezaron a analizar en un lapso de 1 a 2 h después de la colecta de la muestra, posteriormente se filtraron a través de papel filtro No. 1 y millipore (0.45 µm). Éstas se diluyeron con agua bidestilada en una relación de 3:1 (orina-agua). La orina anormal se obtuvo de la misma forma que la anterior a partir de 6 adultos de ambos sexos (35-48 años) con problemas de producción de piedras urinarias. La orina artificial se preparó de acuerdo al método de Burns.⁹

Para la preparación del control de oxalato de calcio se agregó una solución de oxalato de sodio (5 mmol/L) en proporción de 1:1 a una solución de cloruro de calcio dihidratado (5 mmol/L) después de mezclar, la turbidez de la solución se midió en un intervalo de tiempo de 1 a 10 minutos usando el método de nefelometría¹⁰ el cual consiste en medir la dispersión de la radiación en partículas suspendidas siguiendo la siguiente relación: -logPs/Po = k'bc

K = constante de turbidez, que depende del sistema

C = concentración

B = longitud de la celda

Ps = la intensidad de la radiación transmitida en el ángulo de observación Po = el rayo incidente

En el control de fosfato de calcio se adicionó una solución de fosfato de sodio (5 mmol/L) en proporción de 1:1 a una solución de cloruro de calcio dihidratado (5 mmol/L) después de mezclar, la turbidez de la solución se midió en un intervalo de tiempo de 1 a 10 minutos usando el método de nefelometría.¹⁰ Para la comparación de la actividad inhibitoria en la formación de cristales de oxalato y fosfato de calcio en los diferentes tipos de orinas se utilizaron 8 mL de cada una de ellas y 1 mL de cada reactivo. Esta técnica nos proporciona una estimación indirecta de la cantidad de material formado en un determinado tiempo. La turbidez obtenida en los grupos control se comparó con la causada por la adición de las sales (oxalato de sodio, fosfato de sodio y cloruro de calcio dihidratado) y las isoflavonas [A] y [B] en concentraciones de 0.005 mmol/L a las orinas normales, anormal y artificial. Cada experimento se realizó por triplicado y los resultados son un promedio de ellos.

Crecimiento de cristales

Todos los experimentos reportados en este estudio se realizaron en un reactor de vidrio a 37 ± 0.1°C. Para la preparación de la solución supersaturada se agregó lentamente una solución stock de calcio a una solución de oxalato de sodio con agitación vigorosa. El volumen final de esta solución fue de 1,500 mL. La concentración del ion calcio libre se midió por medio de un electrodo selectivo de ion calcio (Ca-ISE Ingold, UK) el cual fue calibrado *in situ*. La estabilidad de la solución supersaturada se determinó a las 24 horas de su preparación midiendo la concentración total de calcio por absorción atómica (Spectrometry Perkin Elmer 305A). El crecimiento del cristal se inició sembrando cristales (10-100 mg.L), el crecimiento de éstos se inicia inmediatamente después del sembrado. La supersaturación de la solución se mantiene constante con la adición de una solución titulante.¹¹ Inmediatamente después se agregan las soluciones de calcio y oxalato (1:1), controlando la adición de las soluciones titulantes por medio del ISE de calcio el cual monitorea la actividad de calcio libre en la solución supersaturada. Las soluciones titulantes se prepararon con 0.15 M de NaCl de la siguiente forma:

Bureta 1

Solución de calcio: C[Ca]t + 2[Ca]t M cloruro de calcio

Bureta 2

Solución de oxalato: C[OX]t + 2[OX]t M oxalato de sodio C es una constante y su valor depende de la velocidad de precipitación, se determinó en experimentos preliminares manteniendo la supersaturación constante. En nuestro experimento el valor de C encontrado fue de 10 y C[Ca]t: 2[OX]t = 1:1. Para mantener constante la fuerza iónica en ambas buretas se empleó NaCl a una concentración de 0.15-2C[Ca]t M. El volumen y el tiempo de titulante adicionado fue anotado para su uso posterior. Los datos obtenidos de las velocidades se trabajaron en la computadora con un programa de cuadrados polinomiales.¹² El pH en todos los experimentos fue de 6.0, este valor no afecta los parámetros cinéticos de la solución.¹³ La concentración de las isoflavonas usadas en estos experimentos sobre el crecimiento del cristal fueron de 5 × 10⁻⁵M, 5 × 10⁻⁴M y 5 ppm.

RESULTADOS

La inhibición del crecimiento de los cristales se midió tomando como base la turbidez producida en el grupo control por las reacciones:

- 1) $\text{CaCl}_2 + \text{NaC}_2\text{O}_4 \rightarrow \text{CaC}_2\text{O}_4 + \text{NaCl}$
- 2) $\text{CaCl}_2 + \text{Na}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{NaCl}$

Estos datos se compararon con la turbidez causada por la adición de estas sales a las orinas normal, anormal y artificial y con los obtenidos de la adición de las isoflavonas [A] y [B] a las diferentes orinas. Los resultados se presentan en las figuras 1, 2, 3 y 4. El oxalato de sodio, cloruro de calcio y fosfato de sodio se mezclaron en igual concentración (mmol/L) en cada experimento. Cuando se utilizaron concentraciones debajo de 2 mmol/L de oxalato y fosfato se observó una inhibición de la turbidez del 100%.

El cambio de la concentración de oxalato en las diferentes orinas tratadas con isoflavona [A] fueron estadísticamente significativas produciendo una reducción de 64.23 (normal), 38.60 (anormal) y 22.43% (artificial) cuando se agregan 6 mmol/L de oxalato de sodio y cloruro de calcio. La máxima actividad inhibitoria de este compuesto (100% de reducción) se observó a concentraciones menores de 3 mmol/L de oxalato y fosfato. La turbidez observada a diferentes concentraciones de fosfato de sodio y cloruro de calcio (6, 5, 4, 3 mmol/L) en las tres orinas disminuyó notablemente en la presencia del compuesto [A]. La actividad mínima observada se presentó con la adición de 6 mmol/L de estas sales produciendo una disminución en la turbidez de 38.61, 70.31 y 44.57% en las orinas normal, anormal y artificial respectivamente.

El efecto inhibitorio del compuesto [B] en la formación del oxalato de calcio se observó en todas las con-

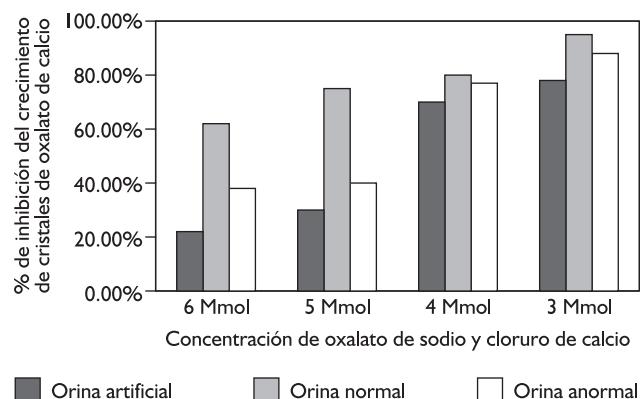
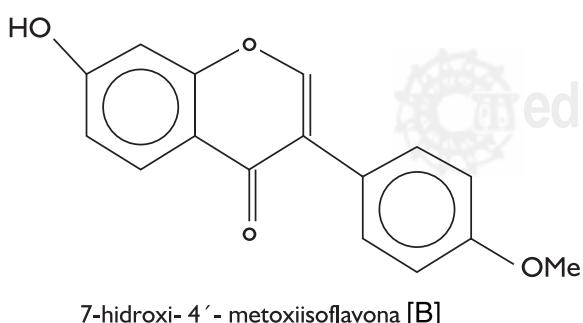
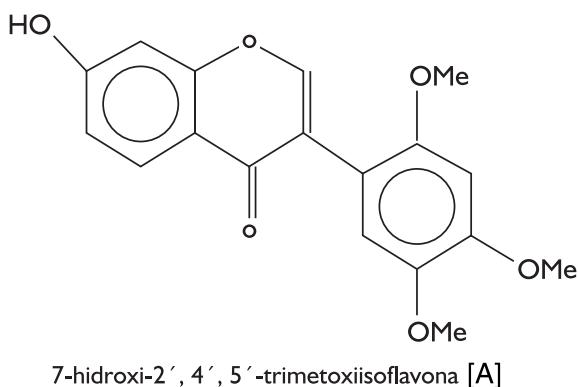


Figura 1. Inhibición de la formación de oxalato de calcio por 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavaona [A].

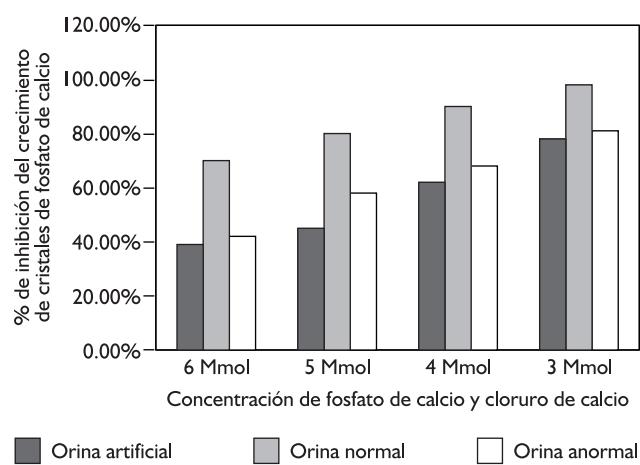


Figura 2. Inhibición de la formación de fosfato de calcio por 7-hidroxi-2',4',5'-trimetoxiisoflavaona [A].

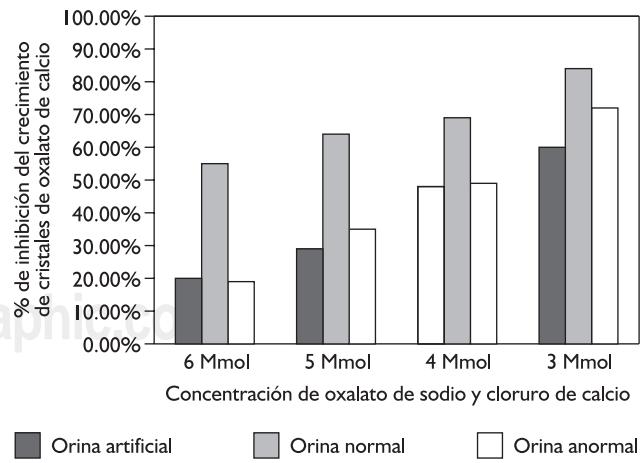


Figura 3. Inhibición de la formación de oxalato de calcio por 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavaona [B].

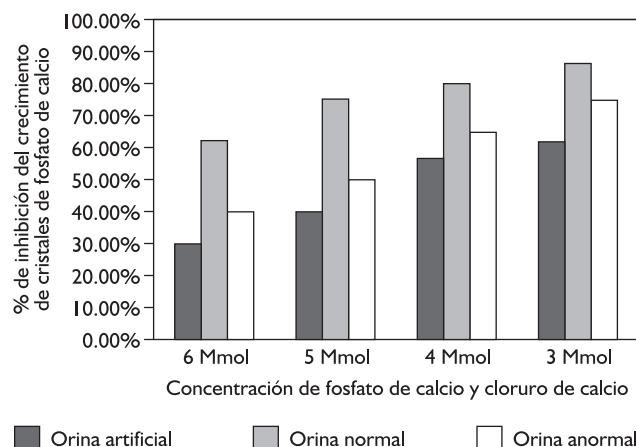


Figura 4. Inhibición de la formación de fosfato de calcio por 7-hidroxi-4'-metoxiisoflavana [B].

centraciones usadas. Con la adición de 6 mmol/L de oxalato y cloruro a las orinas normal, anormal y artificial la disminución de la turbidez fue de 55.95, 18.62 y 20.32% respectivamente en relación del control. La orina normal con 3 mmol/L de oxalato y cloruro presenta el 100% de disminución en la turbidez. La actividad del compuesto [B] sobre la formación de fosfato de calcio (6 mmol/L fosfato + cloruro) fue de 63.80, 40.61 y 30.16% de disminución en la turbidez en la orina normal, anormal y artificial respectivamente.

La velocidad del crecimiento del cristal en términos de logaritmo es la relación en la supersaturación de Ω_{COM} , con respecto a COM. La supersaturación relativa de σ_{COM} es definida como:¹⁴ $\sigma_{COM} = \Omega^{1/2}_{COM} - 1$.

La velocidad R_{COM} , medida mostró una marcada dependencia de la supersaturación en la cual las fuerzas de atracción para la formación de COM está directa-

mente relacionada con la supersaturación relativa σ .¹⁵ Los resultados se presentan en el cuadro I. A los datos cinéticos obtenidos se les aplicó la ecuación:

$$R_{COM} = K' \sigma^n$$

La constante $K' = K_s$ es relacionada con s como una función del sitio activo de crecimiento de los cristales usados como semillas para la iniciación del crecimiento cristalino. La actividad inhibitoria de las isoflavonas sobre el crecimiento del cristal de COM es expresado¹⁶ como:

$$\% \text{ inhibición} = 100 (R_o - R_i)/R_o$$

R_o , R_i = velocidad de crecimiento del cristal COM medido en ausencia y en presencia de las isoflavonas [A] y [B].

La velocidad de crecimiento y nucleación de los cristales de oxalato de calcio se graficaron contra la concentración de las isoflavonas, los resultados cinéticos se presentan en la figura 5. La medida de la velocidad del crecimiento del cristal en condiciones de supersaturación constante es una función de supersaturación relativa con respecto a COM, 37°C, 0.15 M NaCl, calcio total = oxalato total. El compuesto [A] ejerce una máxima respuesta de 89% de reducción a una concentración de 4.6×10^{-4} M. La administración del compuesto [B] produce una marcada disminución en la velocidad de crecimiento y nucleación de los cristales de oxalato de calcio a una concentración de 4.6×10^{-4} M (72% de reducción).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En todas las orinas probadas las isoflavonas 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxiisoflavana y 7-hidroxi-4'-etoxiisoflavana aisladas de la madera de *E. polystachya*

Cuadro I. Velocidad de crecimiento de COM a condiciones de supersaturación constante; 37°C, calcio total Ca_t , oxalato total Op , NaCl 0.15M.

Experimento	$Ca_t/10^{-4}$ M	ΔG_{COT}	ΔG_{COD} KJmol-1	ΔG_{COM}	$R_{COM} 1 \times 10^5$ mol $\text{min}^{-1} \text{m}^{-2}$
1	4.4	-0.51	-1.18	-2.04	5.9
2	4.2	-0.37	-1.06	-1.90	5.2
3	4.0	-0.27	-0.94	-1.80	4.9
4	3.8	-0.13	-0.80	-1.65	4.2
5	3.6	0.0	-0.68	-1.54	3.3
6	3.4	+0.11	-0.51	-1.37	2.3
7	3.2	+0.29	-0.38	-1.25	1.9
8	3.0	+0.42	-0.20	-1.06	1.4
9	2.8	+0.60	-0.02	-0.92	1.2
10	2.6	+0.82	+0.15	-0.72	0.8
11	2.4	+0.97	+0.31	-0.50	0.5

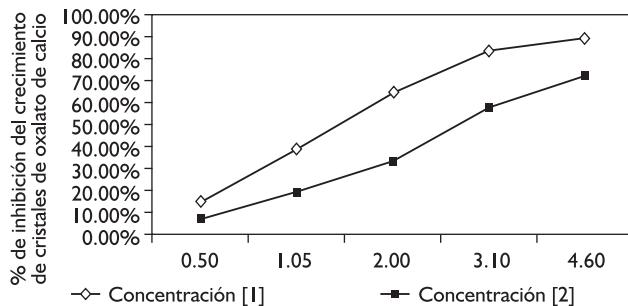


Figura 5. Crecimiento cinético de semillas de oxalato de calcio en solución acuosa supersaturada producido por 7-hidroxi-2', 4'5'-trimetoxisoflava [1] y 7-hidroxi-4'-metoxisoflava [2].

reducen significativamente la cantidad de oxalato de calcio y fosfato de calcio formado. Cuando se compararon los resultados obtenidos en el grupo control con los presentados con los compuestos [A] y [B] a las mismas concentraciones (0.005 mmol/L), se encontró que el compuesto [A] produce una mayor inhibición en la velocidad de formación de oxalato de calcio y fosfato de calcio que el compuesto [B]. Ambos compuestos tienen una mayor actividad inhibitoria sobre la formación de fosfato de calcio que sobre la del oxalato de calcio. La orina artificial no contiene ningún inhibidor natural (ácido cítrico, ácido isocítrico, pirofosfato y ácido mucopolisacárido) presente en la orina normal y solamente se observó un cambio en la turbidez cuando se le adicionó los compuestos [A] y [B]. Los resultados cinéticos obtenidos confirman que las isoflavonas [A] y [B] funcionan como inhibidores en la formación y crecimiento del cristal de COM. Estos compuestos pueden ser recomendados a pacientes que presenten anomalías en los constituyentes de la orina como una medicina preventiva en la formación de piedras renales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sutor DJ, Percival JM. An assay method for the measurement of urinary inhibitors of calcium phosphate formation. *Clinica Chimica Acta* 1978; 89: 267.
2. Meyer JL, Smith LH. Growth of calcium oxalate crystal. II Inhibition of natural urinary crystal growth. Inhibitors. *Investigative Urology* 1975; 13: 36.
3. Fleisch H, Bisaz S. The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia* 1964; 20: 276.
4. Backman WG, Danielson BG, Johansson G, Ljunghall S, Wikstrom B. Magnesium metabolism in renal stone disease. *Scand J Urology and Nephrology* 1979; Supplement 51.
5. Robertson WG, Peacock M, Heyburn PJ, Marshall DH. Risk factors in calcium stone disease of the urinary tract. *British J of Urology* 1978; 50: 449.
6. Coe FL, Parks JH. *Nephrolithiasis pathogenesis and treatment*. Chicago, IL, Year Book Medical 1988: 1-37.
7. Pérez GRM, Vargas SR, Pérez GS, Zavala SM. Antiurolithiatic activity of *Eysenhardtia polystachya* aqueous extract on rats. *Phytotherapy Research* 1998; 12: 144.
8. Perez GRM, Vargas SR, Perez GS, Zavala SM, Pérez GC. Antiurolithiatic activity of 7-hidroxi-2', 4', 5'-trimetoxisoflava y 7-hidroxi-4'-etoxisoflava from *Eysenhardtia polystachya* J. Herbs, Spices & Med. Plants 2000; 7: 27.
9. Burns JR, Finlayson B. A proposal for a standard reference artificial urine *in vitro* urolithiasis experiments. *Invest Urol* 1980; 18: 167.
10. Watty BM. *Química analítica*. Alhambra Mexicana 1989; 508.
11. Bouropoulos N, Bouropoulos C, Klepetsanis PG, Melekos M, Barbalias G, Koutsoukos PG. A model system for the investigation of urinary stone formation. *Br J Urol* 1996; 78: 169.
12. Sheehan ME, Nancollas GH. Calcium oxalate crystal growth: a new constant composition methods for modeling urinary stone formation. *Inv Urol* 1980; 17: 446.
13. Grases F, March JG, Costa B. The crystallization of calcium oxalate at different pH values and in presence of various adenosin phosphates. *J Coll Interface Sci* 1989; 128: 382.
14. Nancollas GH, Mohan MS. The growth of hydroxyapatite crystals. *Arch Oral Biol* 1970; 15: 731.
15. Blacklock NJ, Garside J. Effect of magnesium on calcium oxalate crystallization. *J Urology* 1985; 133: 123.
16. Rogers AL, Garside J. The nucleation and growth kinetics oxalate in the presence of some synthetic urine constituents. *Invest Urol* 1981; 18: 484.