



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**ABSORCIÓN DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Solanum bonariense* EN EL
TRACTO DIGESTIVO DE BOVINOS Y RATAS.**

FERNANDO DAVID GUTIERREZ ALVAREZ

TESIS DE MAESTRIA EN NUTRICION DE RUMIANTES

**URUGUAY
2009**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrado

**ABSORCIÓN DE LOS DIFERENTES COMPONENTES DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Solanum bonariense* EN EL
TRACTO DIGESTIVO DE BOVINOS Y RATAS.**

Dr. FERNANDO GUTIERREZ ALVAREZ

José Roberto Sotelo
Director de Tesis

José Manuel Verdes García
Co-director de Tesis

2009

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**Guillermo Mattioli; DVM, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad Nacional de la Plata – Argentina**

**María de Jesús Marichal; Ing. Agr, MS
Facultad de Agronomía
Universidad de la República - Uruguay**

**Juan Benech; Lic, MS, PhD
Inst. Investigaciones Biológicas “Clemente Estable”
Ministerio de Educación y Cultura - Uruguay**



FACULTAD DE VETERINARIA
Programa de Posgrados

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

DE MAESTRÍA en Nutrición de Rumiantes

“Absorción de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *solanum bonariense* en el tracto digestivo de bovinos y ratas.”

Por: Dr. Fernando David Gutiérrez Álvarez

Director de tesis: Dr. Roberto Sotelo

Tribunal

Presidente: Dr. Guillermo Mattioli _____

Segundo Miembro: Ing. Agr. María de Jesús Marichal _____

Tercer Miembro: Dr. Juan Benech _____

Resultado:

Aprobado con mención

Montevideo, 29 de diciembre de 2009

Escribió el Maestro.....

De la Vida “*No somos perfectos, es evidentísimo, pero somos perfectibles. - He aquí la condición humana mas trascendente. La sensatísima madre de quien esto escribe enseñaba a sus hijos a que diariamente se preguntasen 1° ¿En que mejoré yo hoy?, 2° ¿A quien mejoré?, 3° ¿Que cosa mejoré?.... Y agregaba en nuestro diario vivir no hay nada por mas pequeño que sea que no merezca hacerse bien...He ahí el sentido ético-estético de nuestra vida cotidiana”*

Del Trabajo “*Se admira a los grandes hombres, noble admiración, pero suele imitárseles mas en las extravagancias, cuando ocurren en sus complejas vidas, que en la heroica tenacidad para ascender al altiplano de los valores que jamás envejecen. Trabajemos...He aquí la palabra mágica, pero empieza a ser mágica en el preciso momento que deja de ser palabra”*

Clemente Estable

A mi esposa LAURA y a mis hijos JUANCHI, CUISA, CHULO y CALITA por ser la fuente de mi inspiración y guiar mi camino. Los amo con todo mi corazón!!!

AGRADECIMIENTOS

Profesor José M. Verdes por sus enseñanzas, rigurosidad científica y por sobre todo ejemplo de honestidad y de amor por el trabajo. Su guía, apoyo y amistad han sido fundamentales en mi formación científica y docente. Mi más grande reconocimiento hacia su persona.

Profesor José R. Sotelo por sus enseñanzas, su guía, por sus críticas excelentes y su capacidad para amoldarse a las situaciones más difíciles con el único objetivo que pudiera terminar este trabajo.

Dr. Juan P. Damián por sus enseñanzas en la metodología básica de HPLC, por mostrarme una luz en el camino cuando se complicaban las cosas, por la sutileza y lo excelente de sus críticas. Especialmente por su apoyo y amistad.

Profesor Antonio Moraña por compartir el trabajo en los protocolos experimentales, por su sentido del humor, por sus aportes y por su continuo apoyo en este emprendimiento.

Dr. Aldo Calliari por sus brillantes ideas, por esa calidez de los grandes a la hora de realizar las críticas, por sus excelentes aportes y especialmente por su amistad.

Profesor Guillermo Mattioli por sus enseñanzas en metodología básica, por sus continuos estímulos, por brindarme un espacio en su laboratorio y por su generosidad.

Profesor Jorge Monza del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Agronomía por poner a mi disposición el equipamiento del laboratorio, especialmente el HPLC para el análisis de las muestras.

QF. Osvaldo Rampoldi por sus enseñanzas, sus consejos, su disposición a colaborar y su capacidad de hacer parecer fácil lo difícil y especialmente por su generosidad.

Dr. Mauricio Gutiérrez por sus enseñanzas en el difícil mundo de la estadística, por sus estímulos, por ser el mejor hermano del mundo y por su cariño.

Lic. Alejandro Ruiz-Díaz por sus enseñanzas en química analítica de vegetales, por su continuo estímulo y por su compañerismo.

Profesora. Delma De Lima por sus enseñanzas en metodología básica, por su estímulo continuo, por estar siempre presente y especialmente por su amistad. Mi más grande reconocimiento hacia su persona.

Dr. Bruno López por proveernos de los animales y del espacio para trabajar en el campo de la forma más cómoda, también por su sentido del humor que hace que las horas se vuelvan segundos.

Dr. Claudio Borteiro por su continuo estímulo y por su invaluable ayuda en la redacción de la tesis.

Br. Paúl Ruiz por compartir el trabajo experimental de campo, por su continuo estímulo a terminar la tesis y por las muchísimas horas compartidas en el “sucucho” de Biofísica.

Br. Virginia Delh por compartir el trabajo experimental, por las muchísimas horas compartidas en el sucucho de Biofísica, por su continuo estímulo y por su amistad.

Br. Leonardo Quartino y Br. Matilde Masdeu por compartir el trabajo experimental, por su continuo estímulo, por las muchísimas horas compartidas y especialmente por su amistad.

Profesor Luis Fazio, Dr. Sebastián Picco y Dra. Diana Rosa compañeros del Laboratorio de Nutrición Mineral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP) por sus continuos apoyos y generosidad.

Dra. Vivianne Neirotti, Dra. María A. Olivera, Silvia Chiappe, Andrea Pereyra y Br. Natalia Torterolo mis compañeras de la sección Microbiología de la DILAVE por las muchísimas horas compartidas, por su estímulo, apoyo, generosidad, amistad y especialmente por realizar mi trabajo para que pudiera terminar la tesis. Mi más grande reconocimiento hacia sus personas.

Profesora Elsa Garófalo, Profesora Elsa Tasende, Dr. Marcelo Rodríguez, Dra. Inés Sacchi, Br Sebastián Acuña y Perla Rubianes compañeros de Bioquímica por su apoyo y afecto.

A los compañeros de la Facultad de Ciencias Veterinaria de la UNLP **Profesor Eduardo Gimeno, Profesor Marcelo Pecoraro, Profesora Cecilia Galosi, Profesora Teresa González, Profesor Miguel Petruccelli** por su apoyo y generosidad.

A los Compañeros de la Facultad de Veterinaria de la UNA (Universidad Nacional de Asunción) **Dr. Guillermo Giménez, Dra. Isabel Grau, Dra. Rosmary Rodríguez, Dra. Ana Favero y Dra. María Goretti** y de SENACSA (MOP) **Dra. Verónica Loup**, por brindarme un espacio en su laboratorio, por sus estímulos y por su amistad.

A los compañeros del Instituto Médico Veterinario de la Habana **Dr. Nelvo Sánchez y Dra. Dyanelis González** por sus estímulos y por su amistad.

A mi compañera de Generación y de Posgrado **Dra. Soledad Valledor** por ayudarme a recorrer este camino del posgrado sin claudicar, por sus aportes y especialmente por su amistad.

A mis Padres **Olga y Cono** a los que siempre les estaré agradecido por haber llegado hasta aquí, a mis suegros **Carlos y Lola** que siempre me han apoyado y me han querido como un hijo, a la mejor hermana del mundo **Daniela** que siempre me enseñó a enfrentar las dificultades, a mi ahijada **Camila** por su cariño y a mis abuelas **Italina y Juana** por su sabiduría.

Especialmente a mi esposa **Laura** y a mis hijos **Juan Andrés, José Manuel, Martín y Angelina** que me apoyaron en todo momento, aguantando mi ausencia y tolerándome cuando solo hablaba “de tesis”, principalmente por estar siempre a mi lado y creyendo en mí. Los AMO!!!

Agradezco por encima de todo a **Dios**, que me dio salud, inteligencia y perseverancia para concluir una etapa más de mi vida

INDICE

	PAGINA
1. RESUMEN - SUMMARY	1 - 2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	5
3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS VEGETALES.	5
3.1.1. Características de los metabolitos secundarios de los vegetales.	5
3.1.2. Principales metabolitos secundarios en las Solanáceas.	6
3.1.3. Métodos para la identificación de componentes de plantas y medicamentos.	8
3.2. ASPECTOS RELACIONADOS A LA ABSORCIÓN DIFERENCIAL ENTRE MONOGASTRICOS Y RUMIANTES.	9
3.2.1. Diferencias y semejanzas en la absorción digestiva de diferentes sustancias entre rumiantes y monogástricos.	9
3.2.2. Mecanismos generales de absorción y de resistencia a la intoxicación por alcaloides en diferentes especies animales.	12
3.2.3. Acción de los microorganismos sobre las sustancias activas.	15
3.2.4. Absorción a través de modelos <i>in Vitro</i> .	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.	19
4.1. HIPOTESIS	19
4.2. OBJETIVO GENERAL.	19
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	19
5. ESTRATEGIAS DE LA INVESTIGACIÓN.	20
5.1. Caracterización del extracto hidroalcohólico de <i>Solanum bonariense</i> .	20
5.2. Validación Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) como técnica analítica para extracto hidroalcohólico de <i>Solanum bonariense</i> .	20
5.3. Estudio in vivo del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de <i>Solanum bonariense</i> en terneros y roedores.	20
5.4. Estudio <i>in Vitro</i> del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de <i>Solanum bonariense</i> .	20
5.5. Determinación de tipo de transporte involucrado en la absorción del extracto hidroalcohólico de <i>Solanum bonariense</i> .	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
6.1. Experimento 1.	24
6.2. Experimento 2.	24
6.3. Experimento 3.	25
6.4. Análisis de Resultados y Métodos estadísticos utilizados.	25
7. RESULTADOS	26
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	44
10. BIBLIOGRAFÍA	45
11. GLOSARIO	53
12. ANEXOS	54

1. RESUMEN

El *Solanum bonariense* causa un cuadro cerebeloso en el ganado bovino de pastoreo en el Uruguay, pudiendo ocasionar importantes pérdidas económicas en los establecimientos afectados. Aparentemente la sustancia responsable de dicha intoxicación podría ser algún alcaloide específico de los presentes en la planta, pero no hay evidencia directa que sostenga esta hipótesis.

El objetivo de este estudio fue profundizar en la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en la planta y examinar el transporte relativo de dicha sustancias “*in vivo*” y el transporte potencial “*in vitro*” a través de tejidos aislados de tubo digestivo de bovinos y ratas.

Se realizaron Cromatografía en capa Fina (TLC, sigla del inglés) revelado con reactivo Dragendorff y análisis densitométrico del extracto hidroalcohólico (ExOH) de frutos, hojas y flores de la planta.

Posteriormente se analizó mediante Cromatografía Líquida de alta performance (HPLC, sigla del inglés) y se calculó el coeficiente de partición octanol/agua (KOW, sigla del inglés) de dicho extracto.

A los bovinos, se les administró ExOH mediante fístula ruminal a razón de 1% del Peso Metabólico así como también a ratas por catéter esofágico y se obtuvieron los sueros de ambas especies cada 30 minutos hasta los 180 minutos después del experimento, para analizarlos por HPLC.

Tejido intestinal de ratas y de tubo digestivo de bovinos (reticular, ruminal y omasal), fueron removidos quirúrgicamente y puestos en cámaras parabióticas. A la cara correspondiente a la luz intestinal se le adicionó las mismas concentraciones de ExOH en Ringer fosfato Krebs (KRP) modificado para bovinos (KRPb) y para ratas (KRPr). Todos fueron incubados en condiciones fisiológicas por 240 minutos, tomándose muestras a los 180 y 240 minutos del buffer serosal, las que fueron congeladas para su posterior análisis por HPLC. Se realizaron estudios para comparar el transporte de los componentes del ExOH en tejido ruminal, reticular, omasal de bovinos e intestinal de ratas y determinar si el transporte de esta sustancia es pasivo o activo.

Se encontró que todas las partes de la planta presentan alcaloides específicos, siendo los frutos donde se encuentra una mayor concentración de los mismos. Mediante el uso de HPLC se pudo determinar la presencia de picos en el suero de los bovinos y ratas luego del suministro del ExOH, éstos varían a lo largo del tiempo y difieren entre las especies estudiadas. El tejido Ruminal y luego el reticular presentan un transporte potencial superior al del tejido omasal e intestinal de rata, posiblemente debido a un aumento en el área expuesta por la presencia de papilas, o quizás debido a diferencias específicas en la capacidad de absorción. Los componentes del ExOH de *Solanum bonariense* no se transportaron a través tejido omasal y el transporte fue relativamente bajo en el epitelio intestinal de ratas. Nuestros experimentos sugieren que el transporte de estos componentes es activo y parece ser más alto en el epitelio del tubo digestivo de los rumiantes que en el de las ratas, lo que a su vez sugiere que es un mecanismo específico.

1. ABSTRACT

The shrub *Solanum bonariense* causes a cerebellar disorder in grazing cattle in Uruguay, with potentially important economic losses in affected farms. Apparently, the substance responsible of this poisoning could be specific alkaloids present in the plant, but no direct evidence supports this hypothesis.

The aim of this work was to deepen into the study of secondary metabolites present in the plant and to characterize the relative transport of substances in animals “*in vivo*”, and transportation potential “*in vitro*” by tissues isolated from the gastrointestinal tract of cattle and rats.

We made thin-layer chromatography (TLC) revealed with Dragendorff densitometric analysis of the hydroalcoholic extracts (ExOH) of fruits, leaves and flowers of the plant. Subsequently, samples were analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC) and the partition coefficient octanol / water (Kow) of the extract calculated.

The ExOH was administered at a dose of 1% of metabolic weight to cattle and rats via ruminal fistula and esophageal catheter respectively; sera were collected every 30 minutes and up to 180 minutes of the experiment, and analyzed by HPLC.

Intestinal tissue of rats, and ruminal, reticular, omasal tissues of cattle were surgically removed and placed in parabolic chambers to which were added the same quantities of ExOH in Krebs Ringer phosphate (KRP) modified for cattle (KRPb) and rats (KRPr) on the mucosal side. Tissues were incubated under physiological conditions for 240 minutes, taking samples of serosal buffer at 180 and 240 minutes, which were frozen and subsequently analyzed by HPLC. Studies were conducted to compare substance transport from ExOH by ruminal, reticular, omasal and bovine and rat intestinal tissues to determine whether the transport was passive or active.

We found that all parts of the plant present specific alkaloids, being the fruits the one with higher concentrations of them. The HPLC evidenced peaks in the sera of cattle and rats post ExOH supply that varied over time and greatly differ between species. Ruminal tissue followed by reticular tissue presented relatively higher substance transport when compared to omasal tissue and rat intestine, possibly due to an enhanced absorptive area of papillae. ExOH components of *Solanum bonariense* were not transported across omasal tissue, and transport was relatively low in the intestine of rats. Our experimental design suggests an active transport of these components, and also the involvement of specific mechanisms as it appears to be higher in gastrointestinal tract tissue of ruminants than of rats.

2. INTRODUCCION.

El *Solanum bonariense* conocido como “naranjillo” es el causante de un cuadro cerebeloso que afecta al ganado bovino de pastoreo en el Uruguay (Riet-Correa et al, 1983; Verdes et al, 2000; Verdes et al, 2006). Tanto la toxicidad como el desarrollo de enfermedad cerebelosa en el ganado bovino han sido recientemente confirmadas de manera experimental tras la administración por fístula ruminal de hojas de esta solanácea (Verdes et al, 2006). La intoxicación con esta planta puede ocasionar importantes pérdidas económicas en los establecimientos afectados (Riet-Correa et al, 1983, Verdes et al, 2006).

En casos como el mencionado, se pueden presentar dificultades desde el punto de vista clínico para arribar a un diagnóstico preciso y precoz a campo, ya que en las primeras etapas de la intoxicación, esta planta produce síntomas inespecíficos, lesiones no características, o que no se observan macroscópicamente, afectando sin embargo, de manera específica a las neuronas de Purkinje del cerebelo. En la mayoría de los casos, la mejor forma de apoyar a un diagnóstico de intoxicación por plantas es la confirmación de la presencia de la misma en el entorno del animal, su consumo y su correlación con los hallazgos clínicos. Hasta ahora, en pocos casos se han utilizado ensayos de laboratorio que puedan detectar las toxinas causantes de la intoxicación presentes en las plantas, tanto en el ante-mortem como en el post-mortem de animales domésticos por diferentes fitotoxicosis.

Del punto de vista botánico, las solanáceas son unas de las familias vegetales más ricas en metabolitos secundarios complejos, destacándose una gran variedad de alcaloides, saponinas, alcaloides esferoidales y glicoesteroides, siendo generalmente estos metabolitos secundarios los responsables de su toxicidad (Vázquez, 1997).

En nuestro caso, se ha identificado actividad neurotóxica aguda por la administración intraperitoneal del extracto hidroalcohólico de hojas de este arbusto en roedores. En este extracto se han identificado algunos alcaloides específicos de esta solanácea, aunque aún no se han podido identificar y caracterizar químicamente cuales son las sustancias activas responsables por la toxicidad en el ganado bovino (Verdes et al, 2000; Ruiz-Díaz et al, 2004).

En los roedores, el cuadro nervioso observado tras la inyección intraperitoneal del extracto hidroalcohólico, no se reproduce cuando se suministran diferentes partes de la planta o sus extractos por vía oral, tampoco se reproducen las lesiones histopatológicas características de esta intoxicación, observadas natural o experimentalmente en los bovinos. De acuerdo con lo planteado por otros autores, la identificación de algún animal de laboratorio susceptible a la intoxicación y que desarrolle lesiones similares a las observadas en los bovinos, sería de gran utilidad para el desarrollo de trabajos experimentales que colaboren en el mejor entendimiento de estas enfermedades (Riet Correa, 1983). La purificación y caracterización de la sustancia activa específica sería una herramienta importante para contribuir a la caracterización de este modelo en animales de laboratorio, así como al desarrollo controlado del estudio celular y molecular de esta enfermedad, pudiendo presentar incluso un potencial interés para el estudio de este tipo de enfermedades desde el punto de vista de la Patología Comparada, ya que esta planta desarrolla una degeneración cerebelosa muy específica sobre las células de Purkinje bovinas, sin afectar aparentemente ningún otro órgano o tejido de los mismos.

Pese a que las diferencias observadas entre bovinos y roedores, nos hace pensar en una menor susceptibilidad por vía digestiva de los roedores (probablemente por diferencias en los procesos de absorción de los componentes

tóxicos), esta hipótesis hasta ahora no había sido contrastada experimentalmente para este grupo de solanáceas.

Existen antecedentes similares para otros glicoalcaloides obtenidos del genero *Solanum* en cuanto a la diferencia de absorción y por lo tanto de diferente susceptibilidad entre roedores y el hombre (Keeler y Tu, 1991).

En nuestro caso trataremos de evidenciar y cuantificar las diferencias en el transporte a través del epitelio digestivo de los diferentes componentes de la fracción hidroalcohólica obtenida a partir de hojas de *Solanum bonariense* utilizando para ello, preparaciones *in vitro* de diferentes regiones del tubo digestivo de bovinos y ratas.

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

3.1. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LOS VEGETALES.

3.1.1. Características de los metabolitos secundarios de los vegetales.

Una característica general de todos los vegetales es su habilidad para biosintetizar un amplio rango de compuestos no nutricionales, generalmente de bajo peso molecular, llamados metabolitos secundarios, los cuales cumplen un rol de defensa del vegetal frente a predadores o parásitos (Vázquez, 1997).

El término *compuesto secundario* engloba sustancias químicamente muy diversas y se establece como contraposición a los productos del metabolismo primario, que aparecen en el citoplasma de todas las células vegetales y cuyas diferencias entre plantas son únicamente de índole cuantitativa. En este sentido, se ha propuesto denominar a los compuestos secundarios *sustancias ecológicamente eficaces*, frente a los compuestos primarios que serían *sustancias fisiológicamente eficaces* (Ramos et al, 1998).

Muchos de estos compuestos, denominados agentes alelopáticos son empleados por la planta para causar algún efecto sobre otra planta; atracción de los polinizadores y dispersores de semillas; o como moléculas portadoras de información relacionada con posibles funciones defensivas, como protección contra la radiación ultravioleta y la desecación, o como reserva de nitrógeno (Ramos et al, 1998).

Frente a condiciones climáticas severas las plantas tienden a aumentar sus defensas, sobre todo de tipo cualitativo (producción de alcaloides, glicósidos cianogenéticos, etc), ya que la síntesis de estos productos lleva un menor costo energético que la reparación de los tejidos dañados por los herbívoros (Ramos et al, 1998).

Una característica importante en la estrategia de defensa de las plantas es la distribución variable de los compuestos secundarios en los diferentes tejidos vegetales, dependiendo del valor para la planta, así como su redistribución según avanza el desarrollo fenológico (Ramos et al 1998). Las yemas en crecimiento de los arbustos, las hojas jóvenes, los órganos reproductores, los de dispersión, en general, todas las partes en crecimiento anual muestran una mayor concentración de compuestos secundarios (Ramos et al, 1998).

Dentro de los metabolitos secundarios con significación toxicológica se incluyen los alcaloides (sustancias básicas con nitrógeno en una estructura de anillo), aminoácidos, proteínas y péptidos, glucósidos (grupos químicos como el cianuro vinculados a los azúcares), ácidos (oxálico), terpenos, fenoles, taninos y aceites esenciales. En cada una de las grandes categorías, hay una enorme heterogeneidad química (Tisserand y Balacs, 1995).

Es de destacar que los alcaloides abarcan sustancias pertenecientes a grupos no relacionados entre sí, de las que se conocen más de 20.000 tipos diferentes, entre cuyos precursores se encuentran varios aminoácidos (Culvenor, 1973). Como su nombre lo indica, son sustancias generalmente alcalinas, aunque existen muchas excepciones (Molyneux y Ralphs, 1992).

Una característica de muchos grupos de alcaloides presentes en las plantas forrajeras es su sabor amargo, que posiblemente constituye la base para su identificación y consiguiente rechazo por los herbívoros (Harborne, 1993; Dupont et al, 1994). Sin embargo, algunos tipos de alcaloides presentes en plantas ampliamente extendidas, no poseen ninguna característica discernible en su palatabilidad para los herbívoros (Molyneux y Ralphs, 1992). Incluso, existen excepciones, como los alcaloides (perlolina y perlolidina) contaminantes de gramíneas de pastoreo que a

niveles bajos (0,01 ppm) estimulan el apetito, mientras que a niveles más altos provocan el rechazo en ovejas a pastoreo (Harborne, 1993).

3.1.2. Principales metabolitos secundarios en las Solanáceas.

Las solanáceas son una numerosa familia que incluye 90 géneros y de 3000 a 4000 especies (Vázquez, 1997; Knapp, 2004), de distribución cosmopolita, excepto en regiones muy frías. Son especialmente abundantes en las zonas tropicales y subtropicales de las regiones de América del Sur y Central. El 75% de sus especies pertenecen al género *Solanum* con enorme importancia económica por sus especies comestibles como *Solanum tuberosum*, *melongena*, por las de uso farmacéutico como *Atropa belladonna*, *Hyosciamus níger*, o por las de uso comercial como *Nicotiana tabacum* (Vázquez, 1997). Por lo contrario, algunas especies ocasionan pérdidas económicas por su toxicidad en el ganado bovino como el *Solanum malacoxilum*, *Nierembergia veitchii* (Riet-Correa et al, 2007), *Solanum bonariense* (Verdes et al, 2006).

Las solanáceas son unas de las familias botánicas más ricas en metabolitos secundarios complejos, destacándose una gran variedad de alcaloides, saponinas, alcaloides esferoidales y glicoesteroides. Estos metabolitos representan un importante factor de adaptación ecológica, el que a través de los procesos de co-evolución, llevan a interrelaciones complejas con el resto del ecosistema, en especial con diversos tipos de insectos (Vázquez, 1997).

La naturaleza tóxica de muchos alcaloides de los *Solanum* sobre los insectos esta bien documentada (*Empoasca fabae*), en general se admite que la mayoría de los mecanismos de defensa de los vegetales son de origen químico, mediados a través del metabolismo secundario (Schelee, 1991; Harborne, 1993).

Estos compuestos fueron considerados simples productos de desecho, hasta que en tiempos relativamente recientes, se empezó a comprender su rol de defensa en el vegetal que los produce, frente a predadores o parásitos (Torsell, 1983). A modo de ejemplo, se ha estudiado el potencial insecticida de diferentes partes del *Solanum bonariense* (Pascual-Villalobos et al, 1999).

Hasta el momento se ha encontrado que más de 250 especies de *Solanum* contienen glicoalcaloides y/o saponinas, es por lo tanto posible que aparezcan en todas las especies de este genero, sin embargo esto no significa que los alcaloides del genero *Solanum* sean exclusivos de esta familia, puesto que se han aislado en liliáceas y asclepiadáceas (Vázquez, 1997).

También de diferentes solanáceas se han aislado saponinas, éstas tienen una notoria actividad biológica, incluyendo entre sus efectos: hemólisis, toxicidad para animales de sangre fría y una potente actividad anti-mutagénica y citostática.

Los glicoalcaloides ejercen efectos deletéreos sobre una variedad de sistemas biológicos, que van desde membranas celulares, organelos, células aisladas, organismos inferiores, llegando a afectar incluso al ser humano (Vázquez, 1997).

La mayoría de las especies nativas salvajes de *Solanum* presentan como carácter indeseable su toxicidad. Estudios llevados a cabo con células vegetales, hongos y células de mamíferos muestran que los glicoalcaloides inducen pérdida de contenido celular (Vázquez, 1997).

Es así que a través de estos metabolitos secundarios, muchos miembros del genero *Solanum* causan disfunciones orgánicas y muerte por diferentes mecanismos, describiéndose y atribuyéndose a la ingestión de diferentes especies de *Solanum* variadas enfermedades tanto en los animales como en el hombre. En el caso de las enfermedades que afectan a los animales, se han reportado desde síndromes

neurológicos a hipervitaminosis D (Riet-Correa et al, 2007) y teratogenicidad en el hámster sirio (Baker et al, 1989).

Existe también dentro de este género, un grupo de especies que causan un síndrome cerebeloso en rumiantes en pastoreo en diferentes regiones del mundo. Dentro de las que afectan a bovinos se han descrito: *Solanum kwebense* en África del Sur, *Solanum dimidiatum* Raf. en USA (Bruneton, 2001), *Solanum fastigiatum* Willd. Var. *fastigiatum* en el sur de Brasil (Riet-Correa et al, 1983), *Solanum bonariense* en Uruguay (Riet-Correa et al, 1983; Verdes et al 2006), *Solanum paniculatum* (de Barros et al, 1987; Medeiros et al, 2004).

Debido al hecho de que las alteraciones patológicas observadas en la intoxicación por *S. bonariense* son similares a las constatadas en las enfermedades de depósito lisosomal, existe la posibilidad de que esta planta induzca una enfermedad similar a una gangliosidosis adquirida (Riet-Correa et al, 1983; de Barros et al, 1987), causada posiblemente por un inhibidor de las hidrolasas lisosomales como se ha demostrado en otra plantas como *Swainsona spp.* (Jolly, 1993).

En cuanto a la identificación de sustancias activas en estas solanáceas tóxicas se han encontrado en el *S. dimidiatum* presencia de calisteginas, polihidroxi-nortropanos, como principios tóxicos dotados de propiedades inhibitorias de las glicosidasas (Bruneton, 2001). Estas moléculas están estructuralmente próximas a las hidroxindolizidinas de las *Swainsona* (fabáceas), de las que se conoce la toxicidad nerviosa en los animales y la capacidad de inducir una sintomatología idéntica: el *locoismo*, pero este tipo de principio activo no se ha podido aislar en el *Solanum bonariense* (Verdes et al, datos no publicados).

En el caso de *Solanum bonariense*, se ha identificado en el extracto alcohólico de sus hojas una fracción con actividad neurotóxica en roedores (Verdes et al, 2000; Ruiz-Díaz et al, 2004). La identificación de las fracciones con actividad biológica se realizó mediante la extracción con diferentes solventes (etanol, agua y cloroformo). Se comprobó que las fracciones alcohólica y acuosa desencadenan en los ratones alteraciones nerviosas caracterizadas por los siguientes signos: disturbios locomotores, pasos y saltos hacia atrás, temblores seguidos de estupor, hirsutismo, cianosis, dificultad respiratoria, exoftalmia, depresión. Todos dependientes de la concentración, llegando en las concentraciones mayores a la muerte en pocos minutos. El extracto alcohólico resultó ser más activo que el acuoso, mientras que el extracto clorofórmico resultó inocuo. Se ha identificado mediante Cromatografía de capa fina (TLC) la presencia de alcaloides específicos en el extracto etanólico de *Solanum bonariense* con relaciones al frente (Rf) diferentes a otros alcaloides provenientes de otras especies de solanáceas (Verdes et al, 2000).

Pese a que se han identificado sustancias que generan alteraciones nerviosas en animales de laboratorio (ratones y ratas), hasta el momento en los mismos no se han encontrado lesiones histopatológicas similares a las encontradas en bovinos a los cuales se les había suministrado por vía oral de hojas o extractos de: *Solanum fastigiatum* (Zambrano et al, 1985); *Solanum bonariense* (Verdes et al, 2000) *Solanum paniculatum* (Mesia-Vela et al, 2002). Esto ha sido hasta ahora, una limitante en el estudio comparado de la etiopatogenia de la intoxicación, debido a la imposibilidad de encontrar animales de laboratorio pasibles de intoxicarse experimentalmente y que desarrollen los mismos síntomas y lesiones reportados en los rumiantes.

3.1.3. Métodos para la identificación de componentes de plantas y medicamentos.

Para la identificación de componentes en plantas que contienen alcaloides se realiza extracción etanólica de partes de la planta (por ejemplo: *Capparis himalayensis*) (Li et al, 2008) y evaluarlas mediante TLC con posterior revelado con reactivo de Dragendorff (Galindo et al, 1989). El uso del análisis de imagen (densitometría) de los cromatogramas ha sido utilizado para la cuantificación de alcaloide en frutos de *Solanum khasianum*, *Solanum xanthocarpum*, *Solanum nigrum* (Trivedi y Pundarikakshudu, 2007) y en hojas de *Solanum commersonii* (Pianzola et al, 2005; Siri et al, 2004)

Una de las técnicas más utilizadas por su gran sensibilidad para la cuantificación e identificación de drogas, componentes de extractos hidroalcohólicos de plantas (medicinales / tóxicas) con fines de diagnóstico o su estudio farmacológico es la cromatografía líquida de alta performance de fase reversa (HPLC-RP), algunos ejemplos de su utilización con estos fines y las condiciones de análisis utilizadas se resumen en el Cuadro N° I.

Cuadro N° I. Algunas condiciones de análisis por HPLC de experimentos previos que utilizaron extractos de plantas y sustancias con actividad biológica.

Material Analizado	Condiciones	Fase Móvil	Relación v/v	Autor
<i>Cassia obtusifolia</i>	Columna C18 254 nm	acetonitrilo/ agua	15:85	Hyun-Kim et al, 2007.
<i>Ilex paraguariensis</i>	Columna C18 240 nm	metanol/ agua/ ácido acético	19:81:1.5	Pineda et al, 2007.
<i>Chuanxiong</i> (extractos)	Columna C18	agua/ metanol, ácido acético	55:45:0,5	Xia Li et al, 2001.
<i>Camellia sinensis</i>	Columna C18 280 nm	metanol/ agua/ ácido acético	en gradiente	Zuo et al, 2002.
Cafeína, Aspirina, Acetaminofem	Columna C18 280 nm	metanol/ agua / ácido acético	28:69:3	Fay, 1993.
Cafeína, aminofenol, paracetamol	Columna C18 230 nm	metanol / buffer fosfato		Crevar et al, 2008.
Teofilina, Teobramina	Columna C18 273 nm	metanol/ ácido acético/ acetonitrilo		de Aragao et al, 2005.
Alcaloides y derivados del ergot (<i>nicergoline</i>)	Columna C18 280 nm	metanol/ agua/ ácido acético	80:20:0,1	Ahmad et al, 2002.
<i>Vainilla</i> (extracto alcohólico)	Columna C18 275 nm	Agua/metanol/ácido acético		Jagerdeo et al, 2000.
Cafeína y Teobromina	Columna C18	agua/ metanol/ ácido acético	90:10:1	de Vreis et al, 2006.
Quinidina, quinina, a (<i>Cinchona spp.</i>)	Columna C18	agua/ metanol/ ácido acético		McAlley, 1983.

Se pudo comprobar que el agregado de ácido acético a la fase metanol/agua, aumenta la separación de la teofilina y teobromina, siempre y cuando el pH no sea menor a 4 (de Aragao et al, 2005).

3.2. ASPECTOS RELACIONADOS A LA ABSORCIÓN DIFERENCIAL ENTRE MONOGÁSTRICOS Y RUMIANTES.

3.2.1. Diferencias y semejanzas en la absorción digestiva de diferentes sustancias entre rumiantes y monogástricos.

En líneas generales, el intestino delgado es el responsable de la mayor parte de la absorción en el aparato digestivo de los monogástricos. En cambio los rumiantes tienen una capacidad digestiva potenciada por el hecho de que pueden absorber también grandes cantidades de sustancias al nivel de sus preestómagos (Church y Pond, 1992) Un rasgo distintivo de los herbívoros es la dependencia nutricional de los procesos de fermentación bacteriana que ocurren en su tracto digestivo, que en el caso de los rumiantes se producen a nivel de los preestómagos (Vandamme et al, 2004). Éstos presentan características particulares que los hacen adecuados para procesos fermentativos y digestivos de alta eficiencia (ver Cuadro N° II). Cabe resaltar que la digestión mecánica y la fermentación microbiana representan entre el 60 y el 90 % de la digestión producida en la totalidad del tubo digestivo (García-Sacristán, 1995).

Cuadro N° II. Resumen de las características del ambiente Rumino Reticular en bovinos.

<i>Condición</i>	<i>Valor</i>	<i>Autores</i>
<i>Temperatura (°C)</i>	38-42°	García-Sacristán, 1995; Araujo et al, 2007.
<i>pH</i>	5 -7	Vandamme et al, 2004; Araujo et al, 2007.
<i>Osmolaridad del líquido ruminal (mOsm)</i>	300	García-Sacristán, 1995.
<i>Atmósfera</i>	Anaeróbica (CO ₂ , H, Metano)	Vandamme et al, 2004.
<i>Tiempo Retención (horas)</i>	9-12	Carrillo L, 2003.
<i>Potencial de oxidorreducción (mV)</i>	250-400	Carrillo L, 2003, Araujo et al, 2007.

Morfológicamente la mucosa ruminal esta compuesta por un epitelio estratificado que consta de cuatro capas celulares bien diferenciadas: Estrato córneo, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal (Graham y Simmons, 2005). La misma presenta proyecciones digitiformes y cornificadas visibles a simple vista en

forma de lengüetas (papilas) con el cometido de incrementar la superficie de absorción, siendo sus dimensiones promedio en bovinos de 10 a 15 mm de largo variando con la edad, dieta y localización en el rumen (Steven y Marshall, 1970; Graham y Simmons, 2005; Neiva et al, 2006) presentando una numerosa y rica vascularización (Leonhard-Marek et al, 2005), siendo el área estimada de absorción para la mucosa ruminal de $614.4 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$ en bovinos (Reynolds et al, 2004).

En los monogástricos la absorción de nutrientes se realiza exclusivamente en el intestino delgado y grueso presentando en sus mucosas, salientes en forma de dedo denominados vellosidades digitiformes. Pueden observarse también microvellosidades en la membrana plasmática de las células del epitelio intestinal, lo cual aumenta considerablemente (cerca de 600 veces) la superficie de absorción de la mucosa intestinal. El epitelio del intestino delgado es monoestratificado, cilíndrico y se denomina a sus células enterocitos, debido a la presencia de uniones estrechas (del inglés *tight junctions*), el espacio intercelular es reducido a 0.8 nm (yeyuno humano) y 0.3 nm (colon humano) (García-Sacristán, 1995; Deferme et al, 2000).

Según Deferme et al (2000) las rutas de absorción de drogas y nutrientes a través de la mucosa intestinal son de 2 tipos (figura 1):

a) **Transporte Pasivo**, las cuales dependen del gradiente de concentración y las características de penetración del compuesto a través de la membrana apical y basolateral del enterocito.

- 1) **Transcelular**: Sustancias que presentan mucha liposolubilidad se distribuyen dentro de la membrana celular por vía transcelular pasiva.
- 2) **Paracelular**: Moléculas pequeñas, hidrofílicas y polares son capaces de cruzar la monocapa epitelial por el espacio intercelular (paracelular). Durante los procesos de absorción el espacio intercelular se agranda hasta 2 a 3 μm . Estas uniones estrechas desempeñan una función importante en relación con el paso de sustancias por el epitelio manteniendo diferencias de composición entre la membrana apical y basolateral, conservando la polaridad requerida para los procesos de transporte (García-Sacristán, 1995). La ruta del espacio paracelular resulta generalmente de baja absorción, debido al área superficial limitada.

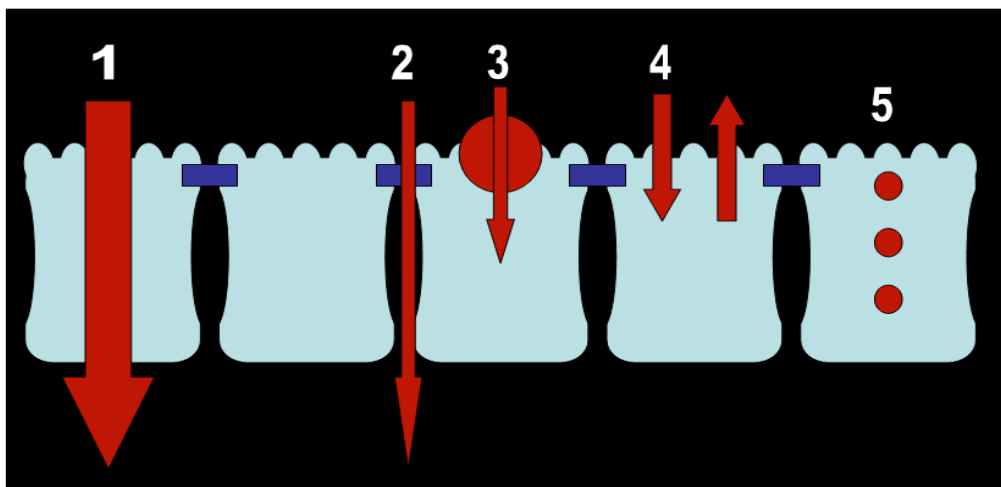


Figura 1: Posibles rutas de transporte de drogas y nutrientes a través de la mucosa intestinal. Modos de **Transporte Pasivo**: Transcelular (1), Paracelular (2). Modos Transporte mediado por Transportadores (3) del **Transporte Activo**: Transporte por Eflujo (4) Transcitosis (5), una combinación de estas rutas a menudo definen el transporte transepitelial completo de alimentos, drogas y tóxicos.

- 3) **Transporte Mediado por Transportadores específicos** (del inglés: *Carriers*), se realizan con sustancias como (Glucosa y aminoácidos) no se consume directamente ATP, sino que esta acoplado al transporte activo de otro ion como el sodio. En este caso el gradiente de Sodio se lo llama facilitante, el carrier utiliza el gradiente de Sodio para transportar glucosa.
- b) **Transporte Activo**, requiere de una fuente directa de Energía.
- 4) **Transporte por Eflujos**, la sustancia ingresa al enterocito por difusión pasiva, y es activamente bombeada al exterior del enterocito. Durante este proceso de transporte se requiere una fuente de energía (ATP), o un gradiente electroquímico generado por otro ión para mover iones o moléculas contra sus gradientes de potenciales electroquímicos. Diferentes transportadores han sido identificados como proteínas con función de ATPasas que cumplen esta función (por ejemplo: la proteína ABC ATPasa Binding Cassette), mientras que las más extensamente estudiadas p-glicoproteínas [por ejemplo: MDRP₁ (Multi-drug Resistance Proteins), MDRP₂, ABCB₁] actúan como una barrera biológica extrayendo las sustancias tóxicas y xenobióticos fuera de la célula (Deferme et al, 2000).
- 5) **Transcitosis**, es el transporte que se realiza utilizando pequeñas vesículas, esencialmente a través de este mecanismo se transportan proteínas y poli-nucleótidos pequeños.

Son numerosos los estudios realizados para evaluar los diferentes tipos de transporte a nivel de los tractos gastrointestinales de rumiantes y monogástricos. En el Cuadro N° III se resumen algunos ejemplos de interés.

Además de los mencionados anteriormente, también existen otros factores que afectan la absorción intestinal, como por ejemplo el incremento del flujo sanguíneo de los enterocitos, la secreción de enzimas pancreáticas, la presencia de sales biliares y las variaciones en el pH de los segmentos intestinales, cuya variación debe ser tenida en cuenta en la absorción de sustancias a través de los epitelios en ratones (Gray et al, 1996). Además, existen varias sustancias químicas derivadas de alimentos, drogas y toxinas que interactúan con la mucosa cambiando la permeabilidad del epitelio por vía de la activación de las uniones estrechas en el epitelio intestinal debido a una condensación de los filamentos de actina inducida por la quinasa de la miosina de cadena ligera (MLCK), la que actúa específicamente abriendo la uniones estrechas (Mineo et al, 2001).

Algunos trabajos han determinado una alta densidad de mitocondrias en las células del estrato basal en relación con el estrato espinoso/ granuloso, compatible con los requerimientos energéticos de los sistemas de transporte activo (bombas) en el rumen (Graham y Simmons, 2005).

En una primera aproximación al estudio de los procesos de difusión, se puede modelar su comportamiento a través del cálculo del coeficiente de partición en fases octanol/agua. El resultado obtenido por este método es una buena simulación de las propiedades de los fosfolípidos de la membrana (Rubas y Cromwell, 1997).

Cuadro N° III. Estudios de sistemas de transporte de sustancias a nivel del tracto gastrointestinal en diferentes especies.

Tipo de Transporte	Sustancia Transportada	Tejido /Especie	Autor
Transcelular	Amonio	Rumen	Bödeker, 1990.
	Amonio NH ₃	Intestino delgado y colon ratones	Mossberg, 1967.
	Ácidos grasos de cadena corta	Rumen	Scheded et al, 1999.
Paracelular	Calcio	Intestino delgado ratones	Mineo et al, 2001.
	Sodio	Rumen	Leonard-Marek et al, 2005.
	Sodio	Rumen	Graham y Simmons, 2005.
Transporte mediado	Sodio /Glucosa	Rumen	McCullum et al, 1998.
	Sodio/Potasio/ 2 Cloros	Rumen	Tsai et al, 2004.
	Sodio/Hidrógeno	Rumen	Leonard-Marek et al, 2005
	Quercetina (SLGT1)	Intestino humano	Gee et al, 2000.
Transporte Activo	Sodio/Potasio	Intestino delgado ratones	Tsai et al, 2004.
	Alcaloides del ergot	Rumen, retículo, omaso	Hill et al, 2001.
	Sodio/Potasio	Rumen	Graham y Simmons, 2005.

3.2.2. Mecanismos generales de Absorción y de resistencia a la intoxicación por alcaloides en diferentes especies animales.

Para el caso de las intoxicaciones con plantas, el desencadenamiento del cuadro depende de la relación entre la absorción y de excreción de sus principios tóxicos (en muchos casos alcaloides) por parte de los animales. Según Ralph et al (1988), los factores involucrados en la magnitud de la absorción de estos principios activos son múltiples, pudiéndose resumir en:

- Cantidad y parte de la planta ingerida.
- Tiempo de retención y de extracción de alcaloides.
- Absorción de alcaloides desde el rumen e intestino.
- Eliminación de alcaloides por riñones e hígado.

Existe también una gran variabilidad tanto en los efectos de algunos tipos de alcaloides extraídos de plantas tóxicas o de sus variedades comestibles, como de la

susceptibilidad a éstos en diferentes especies animales afectadas, algunos ejemplos ilustrativos y sus particularidades se resumen en el Cuadro N° IV.

Esta variabilidad en la intoxicaciones en diferentes especies probablemente es debida a una variación en la expresión de enzimas hidrolíticas específicas como lo es para las diferencias encontradas en la intoxicación con *Datura spp* (alcaloides tropanos) en bovinos y equinos, (Alexander et al, 2008) y una alta resistencia en los conejos, ratas, cobayos y aves. Esta enzima estearasa ahora es conocida como hiosciamina acil-hidrolasa (Bernheim y Bernheim, 1938; Alexander et al, 2008). Los conejos que poseen hiosciamina acilhidrolasa en el suero, también poseen esta actividad enzimática en otros tejidos del cuerpo. Un idéntico sistema enzimático hemotropina estereasa fue encontrado en los cobayos y en las gallinas, pero para el sustrato hemotropina (Alexander et al, 2008).

Es conocido que dentro de los glicoalcaloides existen compuestos más tóxicos que otros, por ejemplo, la tomatina es mas tóxica que la chaconina y ésta a su vez más que la solanina (Friedman, 1991; Valkonen, 1996).

Del mismo modo son numerosos los estudios que revelan las diferencias que existen entre las vías de administración de sustancias activas y los signos y lesiones, así como la cantidad necesaria para ocasionar la muerte al 50% de la población (DL50). Un resumen de estos estudios aparece en el Cuadro N° V.

Cuadro N° IV. Diferencias de susceptibilidad y resistencia a la intoxicación por diferentes vegetales que contienen metabolitos secundarios entre especies animales.

Planta	Especie susceptible	Especie Resistente	Autor
<i>Senecio spp</i>	Equinos, suinos, pollos y bovinos.	Ovinos, caprinos y conejos.	Cheeke, 1988; Smith, 1992.
flavonoides de los ajos (dipropil-disulfido)	Bovinos y con susceptibilidad intermedia los equinos y perros.	Ovinos y caprinos.	Hutchinson, 1977; Verhoeff et al, 1985.
<i>Datura spp</i> (alcaloides tropanos)	Bovinos y equinos.	Conejos, ratas, cobayos y aves.	Bernheim y Bernheim, 1938; Alexander et al, 2008.
hemotropina	Bovinos y equinos.	Cobayos y gallinas.	Alexander et al, 2008.
<i>Solanum bonariense</i>	Bovinos.	Ratas y ratones.	Verdes et al, 2000.
<i>Solanum fastigiatum</i>	Bovinos.	Ratas y cobayos.	Riet-Correa et al, 1983.
<i>Solanum paniculatum</i>	Bovinos.	Ratones	Mesia-Vela et al 2002, Medeiros et al 2004, Verdes et al 2007.
glicoalcaloides	humanos	Ratas	Vázquez, 1997.

Cuadro N° V. Diferencias en la cantidad de sustancia activa para ocasionar algún trastorno de acuerdo a la vía de administración en diferentes especies animales.

Sustancia Activa	Vía S/C	Vía Oral	Vía I/P	Vía IV	Cuadro	Autor
Allicina (ratones)	120 mg/kg			60 mg/kg	LD 50	Cavallito y Bailey, 1944.
Ergotamina (Conejos)		550mg/kg		3,0 mg/kg	LD 50	Alexander et al, 2008.
Chaconina (ratas)			84 mg/kg		LD 50	Keeler et al, 1991.
Chaconina (ratones)			19,2 mg/Kg		LD 50	Keeler et al, 1991.
Solanina (Hombre)		225 mg/Kg			tóxicos	Keeler et al, 1991
Solanina (ovejas)		500 mg/Kg		50 mg/Kg	Letal	Keeler et al, 1991.
Solanina (ratas)		590 mg/Kg	75 mg/Kg		LD 50	Keeler et al, 1991.
Solanina (Ratones)			30 mg /kg		LD 50	Keeler et al, 1991.

En otros casos, los intentos de reproducción de intoxicaciones en animales de laboratorio han sido desalentadores cuando se utilizan directamente las hojas de las plantas causantes de la intoxicación natural o sus extractos por vía oral; algunos ejemplos son *Solanum fastigiatum* (Riet-Correa et al, 1983); *Solanum bonariense* (Verdes et al, 2000) y *Delphinium* spp (Ralph et al, 1988). Por el contrario el uso de otras vías de administración (subcutánea o intraperitoneal) para este mismo tipo de sustancias, han demostrado ser efectivas para desencadenar el cuadro sintomático o incluso provocar la muerte.

Utilizando extractos acuosos de *Solanum paniculatum* intra-duodenalmente, se observó una actividad anti ulcerativa, aunque no se informa de la existencia de otros signos tóxicos ni cuadro nervioso en los ratones tratados, pese a que la planta ha sido reportada como causante de degeneración cerebelosa en bovinos en Brasil (Mesia-Vela et al, 2002, Medeiros et al, 2004, Verdes et al, 2007)

En otros casos se ha reportado baja absorción del 3 - metilindol en el tracto intestinal del hombre, mientras se confirma una alta absorción para este mismo alcaloide en el rumen, además de una alta presencia en plasma sin modificación alguna (Fordtran et al, 1964; Carlson et al, 1975).

La absorción de glicósidos de quercetina, es pobre a nivel intestinal y su transporte se realiza pasivamente, sin embargo luego de una hidrólisis su absorción aumenta rápidamente en intestino aislado de roedores (Gee et al, 2000). Algunos estudios sugieren que los tejidos de los pre-estómagos son un importante lugar de absorción de los alcaloides, debido a que son solubles en los fluidos ruminales (Church, 1979; Ruschbusche y Thivend, 1980), pudiendo ser este el motivo por el cual los rumiantes suelen ser más sensibles a muchos de estos tipos de intoxicaciones con alcaloides. El mecanismo de transporte para alcaloides del cornezuelo es un proceso activo

(inhibido por azida de sodio), el rumen tiene un potencial de transporte 25% mayor que el retículo y aproximadamente 600% mayor que el omaso (Hill et al, 2001).

La transferencia de drogas (tales como pentobarbital, salicilatos y quininas) a través de la pared ruminal, mediante perfusión por sonda (Jenkins et al, 1975) han demostrado la capacidad absorbiva que puede tener el rumen y la validez de los modelos *in Vitro* para absorción de cada tipo de sustancias. Utilizando modelos similares a estos para estudiar la diferente capacidad de absorción del intestino delgado en ratones, se ha podido comprobar que para el caso de las antocianinas existe una mayor capacidad de absorción en el yeyuno que en el duodeno (Matuschek et al, 2005).

3.2.3. Acción de los microorganismos sobre las sustancias activas.

Es bien conocido que el fluido ruminal contiene gran cantidad de bacterias (de 10^{10} a 10^{11} células /ml) predominando las anaeróbicas estrictas, dado que el potencial de reducción es de -0,4 voltios (Carrillo, 2003). Muchos son los beneficios que derivan de la relación simbiótica establecida entre los microorganismos habitantes del rumen y los rumiantes, entre ellos se encuentran la utilización de nitrógeno no proteico, celulosa, síntesis de vitaminas solubles y ácidos grasos esenciales por parte de estos microorganismos (Church, 1992). Las condiciones que mantienen en equilibrio la flora ruminal, pueden verse afectadas tanto por sustancias activas presentes en algunos vegetales, como por el aumento de las bacterias reductoras de sulfito presentes en el rumen de bovinos y ovinos alimentados con cebollas (Lincoln et al, 1992; Knight et al, 2000). Además, la composición de estos microorganismos ruminales puede verse afectada por variaciones en la proporción de acetato, propionato y butirato en bovinos suplementados con aceite de anís (Cardozo et al, 2004).

Por otra parte, dentro de las acciones de los diferentes grupos de microorganismos se encuentran también: la detoxificación de los constituyentes de las plantas o la formación de componentes tóxicos a partir de sustratos vegetales (Carlson et al, 1984). Algunos autores sugieren que la detoxificación microbiana de los xenobióticos jugó un papel importante en la evolución del sistema de fermentación de los pre-estómagos (Freeland y Janzen, 1974; Van Soest, 1994).

Existen otros ejemplos de la capacidad de detoxificación de los pre-estómagos, para el caso de los alcaloides pirrolizidínicos (APs), éstos son parcialmente reducidos en productos derivados no tóxicos en el rumen (Alexanders et al, 2007). Otro ejemplo bien caracterizado lo constituye la heliotrina que es degradada completamente por las bacterias ruminales. Como mencionamos en los ejemplos previos, este mecanismo muestra la potencial competencia que es capaz de desarrollar el rumen para desintoxicar este tipo de sustancias en el propio metabolismo ruminal (Alexanders et al, 2007).

En otros casos, se observa que el sitio de detoxificación para varios alcaloides en rumiantes sin previo contacto con el tóxico (animales “naive”) no era el rumen sino los riñones y el hígado como ocurre en los monogástricos (Aguar et al, 2005).

Las bacterias ruminales tienen un papel importante, no solo en la detoxificación sino también en la formación de compuestos tóxicos, como ser la hidrólisis rápida de glucósidos cianogénicos en cianuros (Carlson et al, 1984).

Es bien conocido que la microflora del intestino grueso de los ratones hidroliza a los glucósidos de la quercetina aumentando su absorción (Gee et al, 2000). El metabolismo intestinal de drogas y sustancias activas puede ocurrir por la microflora presente en el lumen, así como por las enzimas presentes en los fluidos

luminales y en la mucosa intestinal. El metabolismo de los xenobióticos por acción de la microflora es bajo si lo comparamos con el metabolismo de estas mismas sustancias a nivel de la mucosa intestinal y del hígado. Sin embargo, la microflora intestinal (por ejemplo *Bacteroides* y *Bifidobacterias*) pueden jugar un papel importante en el metabolismo de los compuestos que se absorben pobremente o incompletamente en la mucosa intestinal (Gee et al, 2000).

3.2.4. Absorción a través de modelos *in vitro*.

El proceso de absorción *in vivo* es el resultado de una serie compleja de eventos y depende de una multitud de parámetros relacionados con las características de la droga así como de los aspectos fisiológicos del tracto gastrointestinal. Debido a esos factores, ningún modelo *in vitro* sencillo puede imitar la complejidad de los procesos de absorción *in vivo*. Como el proceso intestinal de absorción depende de una multitud de parámetros, no existe un modelo universal para simular dicho proceso (Deferme et al, 2000).

Dentro de los modelos *in vitro* mas conocidos para el estudio de la absorción de nutrientes, el más usado es el de cámaras “Ussing” o “parabióticas”, ya sea mediante la utilización de tejidos digestivos o líneas celulares. La técnica de “Ussing” fue desarrollada originalmente por Ussing y Zerahn para estudios fisiológicos y farmacológicos (transporte iónico y de agua), pero nunca pudieron anticipar la gran cantidad de aplicaciones para las que este sistema fue posteriormente utilizado (Li et al, 2004). La técnica fue posteriormente adaptada para las determinaciones de permeabilidad de tracto gastrointestinal por Grass y Sweetana (Deferme et al, 2000). El método utiliza secciones de segmentos intestinales montados entre dos compartimientos de difusión (serosal y mucosal), a los cuales se les agrega solución buffer fosfato de Krebs (KRP), continuamente gasificada con una mezcla de O₂ 95%: CO₂ 5% (carbógeno) suficiente para mantener la viabilidad del tejido. El compuesto de prueba es añadido al compartimiento mucosal o serosal del tejido para el estudio de las propiedades fisiológicas o nutricionales.

Una revisión de varios sistemas de absorción, muestra que las cámaras parabióticas presentan múltiples ventajas competitivas sobre otros métodos *in vitro* (Deferme et al, 2000). Un resumen de las fortalezas y limitaciones del método se muestra en el Cuadro N° VI.

Cuadro N° VI. Comparación de las fortalezas y limitaciones del modelo *in vitro* “Ussing” o cámaras parabióticas.

Fortalezas	Limitaciones
Buen modelo para pruebas preparativas (del Inglés <i>screening</i>).	Viabilidad de los tejidos.
Buena correlación con los datos de permeabilidad <i>in vivo</i> .	Presencia de capas de músculo circular que en los estudios de permeabilidad pueden resultar en una subestimación de la capacidad absorptiva.
No requiere ensayos biológicos complejos (soluciones tamponadas simples).	Dificultades de disponibilidad de algunos tejidos para estudio (por ejemplo: tejidos de origen humano o de primates).
Permite evaluar diferentes regiones del tracto gastrointestinal.	
Permite evaluar el mecanismo de transporte (por ejemplo, polaridad en el transporte).	
Área absorptiva bien definida.	

La técnica permite determinar el transporte transepitelial de drogas y tóxicos en combinación con el metabolismo intestinal, permitiendo estudiar las diferencias regionales en la absorción intestinal en una misma especie, o la existencia de diferencias de absorción entre diferentes especies (Deferme et al, 2000). Según Hill et al (2001), el uso de cámaras parabióticas presenta grandes ventajas sobre el estudio *in vivo* de la absorción de alcaloides, ya que los tejidos aislados no están sujetos a las variaciones *in vivo* de:

- a) dinámica de los receptores.
- b) funciones metabólicas.
- c) funciones excretoras.

Se menciona como la principal fortaleza de la técnica de “Ussing” su utilidad en ensayos de absorción y biodisponibilidad de diferentes sustancias usando líneas celulares diferenciadas (*Caco2*) derivadas del carcinoma de colon (Maznah, 1999).

Dentro de las principales limitaciones de este método *in vitro* tenemos la viabilidad e integridad de los tejidos montados en las cámaras parabióticas durante períodos prolongados. Habitualmente los ensayos de transporte de drogas se realizan en períodos de 150 a 180 minutos, aunque algunos trabajos demuestran que el tiempo de uso de estas cámaras no debería ser menor a los 180 minutos, en la medida que el tejido se mantenga viable (Deferme et al, 2000). Para confirmar la viabilidad e integridad de los tejidos de segmentos intestinales utilizados en las cámaras de Ussing están ampliamente aceptados algunos parámetros electrofisiológicos, entre los más utilizados tenemos el registro de diferencia de potencial (PD) y el mantenimiento de la resistencia transepitelial (TEER). Medir los parámetros bioeléctricos del segmento intestinal antes de iniciar los estudios de transporte es una estrategia común para asegurar la viabilidad del tejido y para reducir la posible variabilidad experimental (Deferme et al, 2000).

En nuestro caso, se ha demostrado su utilidad para la evaluación de la absorción en porciones específicas de tubo digestivo de rumiantes y monogástricos en diferentes condiciones experimentales y con diferentes sustancias. Algunas de estas condiciones experimentales, así como la especie de procedencia de los tejidos y las sustancias transportadas se resumen en el Cuadro N° VII.

Es importante destacar la relevancia y vigencia que tiene actualmente esta técnica para el desarrollo de experimentos de validación y comparación de la absorción en ratas y para la técnica de perfusión para estudio de pasaje simple en humanos. En estos dos casos, se ha buscado contar con un buen modelo *in vitro* que ayude a comprender los mecanismos involucrados en los procesos absorptivos de la mucosa del tubo digestivo (Lennernas et al, 1997).

Cuadro N° VII. Experimentos realizados utilizando la técnica de “Ussing” para la determinación de parámetros absortivos utilizando diferentes tejidos aislados.

Especie	Tejidos	Sustancia transportada	Autor
Ovino	Omasal.	Aminoácidos.	Mc Collum y Webb, 1998.
Ovino	Ruminal, reticular y omasal.	Aminoácidos.	Mathews y Webb, 1995.
Ovino	Ruminal, reticular y omasal.	Alcaloides del ergot.	Hill et al, 2001.
Ovino	Ruminal.	Amonio / sodio.	Abdoun et al, 2005.
Ovino	Ruminal, reticular.	NH ₄ .	Bodeker et al, 1990.
Ovino	Ruminal.	3-metil-D-Glucosa.	Gabel et al, 2002.
Ovino	Ruminal.	Magnesio / sodio.	Leonhard-Marek et al, 2005.
Ovino	Ruminal.	Sodio.	Lang y Martens, 1999.
Ovino, Cabra	Ruminal.	Sodio.	Leonhard-Marek et al, 2006.
Cabra y rata	Intestino delgado.	Calcio.	Kozakai et al, 2004.
Rata	Intestino delgado.	Quercetina.	Gee et al, 2000.
Rata	Colon.	Aloemodin antrona.	Kai et al 2002.
Rata	Intestino delgado.	Extracto etanólico Planta medicinal.	Tsai et al, 2004.
Humano	Yeyuno.	Sodio.	Berglund et al, 2001.
Humano	Yeyuno.	Goniatoxinas.	Mardonesa et al, 2004.
Ratón	Yeyuno.	Antocianinos.	Matuschek et al, 2005.
Cobayo	Mucosa gástrica.	Amonio.	Suzuki et al, 2000.
Cobayo	Colon.	Veratridina	Lomax et al, 2007.
Cobayo	Mucosa gástrica.	Extracto de hierba medicinal (<i>Croton lechleri</i>).	Miller et al, 2000.
Conejo	Ileon.	Cationes y aniones.	Field et al, 1971.
Conejo	Yeyuno.	<i>Piper logum</i> .	Iwashita et al, 2007.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

4.1 HIPOTESIS: Las dificultades observadas en la reproducción experimental por vía oral en roedores son debidas a:

1. Una diferencia en la capacidad de absorción para este tipo de sustancias a nivel de su tubo digestivo, con respecto a lo que sucede en rumiantes.
2. Una transformación para este tipo de sustancias a nivel del tubo digestivo del rumiante, preferentemente a nivel de los preestomagos.

4.2. OBJETIVOS GENERAL: Determinar los mecanismos responsables de las diferencias de absorción por vía digestiva observada entre bovinos y ratas para los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar los extractos hidroalcohólicos de las diferentes partes de la planta de *Solanum bonariense* y comparalos según su procedencia.
2. Validar la técnica de HPLC para la determinación de picos característicos de *Solanum bonariense* en extracto hidroalacoholicos y sueros de animales intoxicados.
3. Determinar *in vitro* si existen diferencias de absorción intestinal de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* entre los rumiantes y los monogástricos y si se produce alguna transformación de los componentes del extracto durante su transporte.
4. Determinar si la absorción de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico se realizan por medio de un mecanismo de transporte activo o pasivo.

5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.

5.1. Caracterización del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

Se elaboraron extractos hidroalcohólicos de las diferentes partes de *Solanum bonariense* (hojas, flores y frutos maduros) y se procedió a identificar mediante el uso de Cromatografía en capa fina (TLC), cada una de las fracciones por sus respectivas Relaciones (cociente) respecto al frente de avance del solvente (Rf), comparándolas con el Rf de un alcaloide estándar (solanina). Una vez caracterizados los extractos se procedió a la identificación y cuantificación de componentes mediante densitometría utilizando el programa TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd, 2005, USA).

5.2. Validación Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) como técnica analítica para extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

Se procedió a la búsqueda de protocolos de HPLC para este tipo de extractos con el fin de encontrar alguno con la suficiente sensibilidad para mejorar la caracterización de los componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* y para el estudio de los mismos en los experimentos *in vivo*.

5.3. Estudio *in vivo* del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en bovinos y ratas.

Para analizar si existen diferencias de absorción entre rumiantes y monogástricos para los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*, se administró el extracto a través de sonda ruminal en bovinos y por vía oral en ratas mediante un catéter oro-esofágico (Zuñiga et al, 2001). Posteriormente se procedió a la extracción de muestras de sangre cada 30 minutos en bovinos. En las ratas, las muestras sanguíneas se obtuvieron por extracción cardíaca al momento del sacrificio (una muestra por animal) a tiempos crecientes (de 0 a 180 minutos). Se determinó la presencia y concentración de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico en suero mediante HPLC, en ambas especies.

5.4. Estudio *in vitro* de la absorción intestinal de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

Para realizar el estudio *in vitro* de la absorción de los diferentes componentes del extracto se utilizaron tejidos de diferentes porciones del tubo digestivo de bovinos (rumen, retículo, omaso) y ratas (yeyuno) y se montaron en cámaras parabióticas en las cuales se introdujeron cantidades conocidas de extracto hidroalcohólico, y se procedió a la extracción de muestras a los 180 y 240 minutos para evaluar la absorción de los diferentes componentes mediante HPLC, en ambas especies.

5.5. Determinación de tipo de transporte involucrado en la absorción del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

Mediante el uso de cámaras parabióticas se expuso la luz intestinal al extracto hidroalcohólico en las mismas cantidades que en el estudio *in vitro* más 0,2 % de azida de sodio que inhibe el transporte activo (según Hill et al 2001) por inhibición de la fosforilación oxidativa, a través del bloqueo del complejo IV de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Se procedió a la extracción de muestras a los 180 y 240 minutos para su posterior análisis de presencia y concentración de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico mediante HPLC.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de la planta: Para este ensayo, se obtuvieron plantas completas en los meses de enero-febrero del predio central de Facultad de Veterinaria y del predio de Sayago de la Facultad de Agronomía, siendo identificadas como *Solanum bonariense* (Linnaeus, 1753) por la Cátedra de Botánica de esta última. Posteriormente se procedió a la clasificación y disección de las partes de la planta en tres grandes grupos (hojas, flores y frutos), manteniendo su identificación y lugar de procedencia, las cuales fueron desecadas a la sombra hasta la elaboración de los extractos hidroalcohólicos.

Obtención de los extractos hidroalcohólicos: Se elaboraron los diferentes extractos hidroalcohólicos a partir de 1kg de hoja, 1kg de fruto maduros y 1kg de flores en cada condición, adicionándoles 4 litros de una mezcla de etanol:agua (70:30), manteniéndolos en maceración por 3 días a temperatura de laboratorio. Posteriormente se procedió a la roto-evaporación del solvente con un equipo (Far® Decalab) a 45 °C, vacío entre 200-600 mmHg y posteriormente se reconstituyó el liofilizado con agua destilada para su posterior caracterización química y con el buffer específico para los experimentos *in vitro*, conservándose a 4°C para la realización de los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Caracterización de los extractos hidroalcohólicos. Se estudiaron los aspectos correspondientes a la identificación de las diferentes fracciones del extracto mediante Cromatografía en capa fina (TLC), usando láminas K6F Silica gel 60 A 250 µm (Whatman Inc, USA), para lo cual se realizó una separación preparativa en corridas simultáneas de los tres extractos, usando como fase móvil una mezcla de 60% de cloroformo, 35 % de etanol y 5% de amoniaco al 2% comparando las diferentes fracciones y revelándolas posteriormente con Reactivo de Dragendorff y secándolas posteriormente en estufa a 70°C, posteriormente se realizó un escaneo de los cromatogramas, seguido de un estudio densitométrico usando el programa TotalLab (Nonlinear Dynamics Ltd, 2005, USA). A lo largo del experimento se mantuvieron la identificación del lugar de procedencia de cada muestra para la evaluación de los componentes según el lugar de cosecha de la muestra.

Para conocer el espectro de absorción del extracto hidroalcohólico se realizó una búsqueda de absorción máxima a longitudes de onda entre 190-360 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu, modelo UV mini-1240 y 30 µl de extracto hidroalcohólico de hoja reconstituido en 1000µl de Agua destilada respectivamente. Posteriormente se realizaron corridas en HPLC a las longitudes de onda donde se encontraron mayores unidades de absorbancia, probando diferentes fases móviles utilizadas comúnmente para alcaloides, en busca de picos característicos para el extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense*.

Para la caracterización de nuestro extracto, se utilizó un HPLC marca VARIAN Pro-Star Modelo 410 photodiode array detector, columna C 18 simétrica (150 X 4.5 mm i.d 5µm) flujo de 2,1 ml/min, durante 10 minutos, 35° C de temperatura, 10 a 12 mmHg utilizando como fase móvil Agua: Metanol: Ácido Acético (proporción 69:28:3) luego de realizar corridas con los protocolos utilizados para este tipo de extractos y sustancias indicadas en el Cuadro I.

Se procedió al calculo *coeficiente de partición* (K_{OW}) del extracto hidroalcoholico de hojas de *Solanum bonariense*, mediante la disolución de esa sustancia en una mezcla

bifásica formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio: n-octanol y agua, según la fórmula: $Kow = \frac{\text{concentración soluto en octanol}}{\text{concentración soluto en agua}}$ y mediante el análisis por HPLC de los solventes utilizados en las condiciones anteriormente enumerada.

Animales de laboratorio: El protocolo fue previamente aprobado por la Comisión de Bioética de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay). Se realizaron estudios *in Vivo* e *in Vitro* del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en bovinos y ratas.

Para lo cual se utilizaron un total de 18 ratas Wistar machos (8 semanas de edad) procedentes del Bioterio del IIBCE (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable), las cuales permanecieron en jaulas en una habitación con temperatura controlada (21 ± 1 °C), humedad (55 ± 5 °C) y luz (12h ciclos luz-oscuridad). Las ratas tuvieron acceso ilimitado agua desmineralizada y comida hasta el día del experimento, siendo alimentadas con ración laucha Premium (Empresa VITARON S. A., Montevideo, Uruguay) con la composición indicada en el Anexo I.

Se utilizaron 3 bovinos Holando machos de 2 años, mantenidos en el campo N° 2 de la Facultad de Veterinaria (Libertad, San José) alimentados con pastura natural, fardo de alfalfa y ración (composición en Anexo II), agua “*ad libitum*”.

Preparación de los tejidos para el estudio *in Vitro* en ratas: Durante la noche previa al día del experimento 6 ratas fueron privadas de alimento y posteriormente fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal con solución de tiopental sódico y decapitadas inmediatamente. Al minuto de haber sido eutanasiadas, a cada rata se le realizó una incisión abdominal media; el intestino fue disecado y sumergido rápidamente en una solución KRPr (Mineo et al, 2001) estéril con la composición como lo indica el Anexo III, a temperatura ambiente. Se extrajeron dos piezas de 5 cm aproximadamente de yeyuno, las cuales fueron abiertas longitudinalmente a lo largo del borde mesentérico, posteriormente se las mantuvo en una solución de KRPr gasificada con carbógeno (O₂ 95%: CO₂ 5%) a 37°C hasta ser montados en cámaras parabióticas individuales (cámaras de Ussing).

El tipo de cámara utilizada en este experimento se denomina cámara de perfusión continua y consiste en dos compartimientos idénticos o “hemicámaras” diseñadas para minimizar la presión hidrostática y prevenir el daño del tejido a estudiar durante la perfusión, a una de las hemicámaras se le denomina compartimiento mucosal por estar expuesto el lado mucoso del tejido digestivo a estudiar, mientras que al otro se le denomina compartimiento serosal. La solución se agita en ambas hemicámaras con una solución de carbógeno (AGA, Uruguay) manteniendo de esta forma una presión adecuada de oxígeno. Cada una de estas medias cámaras tiene 25 ml de capacidad. La temperatura para los experimentos con intestino aislado de ratas se mantuvo a 37 °C mediante un baño de agua termostatzado.

Posteriormente se seccionaron los tejidos en fracciones de 2 x 2 cm y se colocaron en las cámaras parabióticas, interponiendo entre el tejido y el borde de la cámara arandelas de gomas siliconada para evitar el daño al tejido evaluado y posteriormente se sellaron las cámaras con clamps, siendo el área de tejido expuesta entre los dos compartimientos de 0,21 cm² como se ve en la figura N°2.

El volumen de la solución KRP adicionado en cada compartimiento fue de 15 ml con un pH de 5,5 debido a que se utilizaron muestras de yeyuno en estos experimentos. Durante todo el experimento los tejidos fueron clampeados, midiendo sus diferencias

de potencial, usando para ello, electrodos impolarizables de plata clorurada (en tubos de gel con Ringer) conectados a un multímetro digital (marca Goldstar MD 333, Corea).

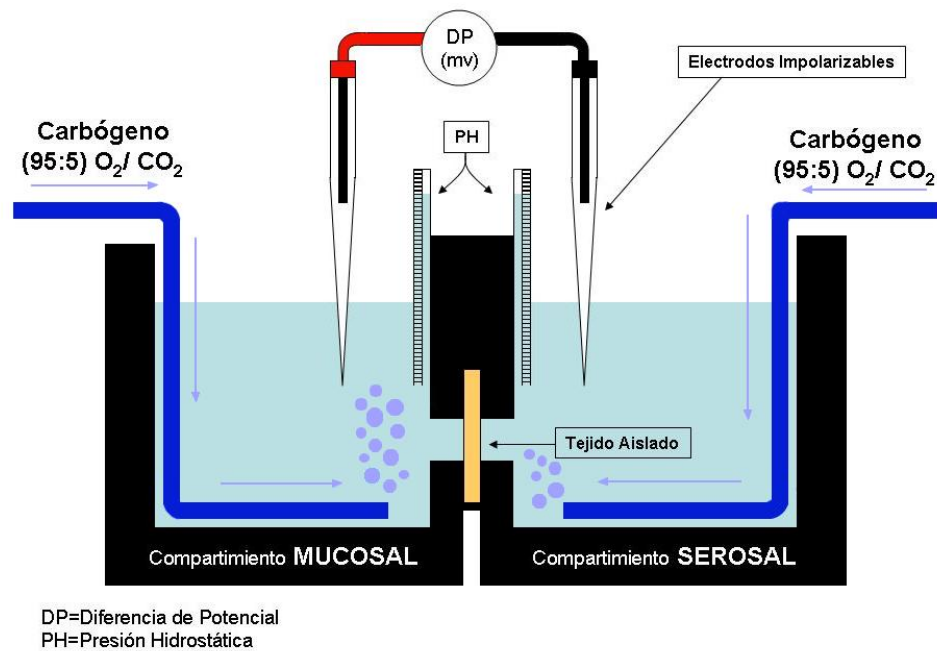


Figura 2. Esquema general de la cámara parabiótica “Ussing” usada para los experimentos “In Vitro”, para todos los experimentos el extracto reconstituido se agrega en el compartimiento *Mucosal* a la izquierda de la ilustración y la muestra se extrae del compartimiento *Serosal* a la derecha de la misma.

Se descartaron todos los tejidos que tuvieran registros de diferencia de potencial menores o iguales a 4.5 milivoltios ($\Delta v \leq 4,5 \pm 0.3$ mv) según los valores normales encontrados en ileon aislado de conejos (Rose y Schultz, 1971), una vez estabilizada la diferencia de potencial entre los compartimientos se procedió a la realización de los experimentos previstos.

Preparación de los tejidos para el estudio *in vitro* en bovinos: Para todo el experimento se usaron tejidos del tracto digestivo obtenidos de bovinos sacrificados por exsanguinación posterior a inducción anestésica intravenosa con tiopental sódico, luego se procedió a la exéresis de los tejidos para el ensayo. En los bovinos se removieron quirúrgicamente los compartimientos ruminal (saco ventral posterior), reticular y omasal de los animales hasta 5 minutos después de muertos, los cuales se vaciaron de sus contenidos por inversión, limpiaron con agua destilada y se transportaron al laboratorio en una solución salina de cloruro de sodio al 0,85% estéril. Los tejidos en el laboratorio fueron dispuestos inmediatamente en una solución de KRP con la composición indicada en el Anexo III (Hill et al, 2001).

Los tejidos ruminal y reticular se prepararon removiendo la musculatura de la cara serosa para luego ser montados en la cámara parabiótica (Mattews y Webb, 1995) con KRPb, perfundido continuamente con carbógeno y mantenidos a 39 °C. Los tejidos se montaron en las cámaras de la misma manera que el procedimiento descrito para el intestino aislado de ratas. Aproximadamente pasaron 30 minutos desde la eutanasia de los animales y el montaje del diseño experimental del sistema en el baño de agua termostatzado.

6.1. Experimento 1: *Estudio in vivo del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de Solanum bonariense en bovinos y ratas.*

Se le administró a 2 bovinos de la raza Holando por medio de una fístula ruminal, extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* liofilizado reconstituido en agua destilada, equivalente al peso-planta correspondiente al 1,0 % del Peso metabólico (de acuerdo a la formula $\text{Peso Metabolico} = \text{Peso Vivo}^{0.75}$) de acuerdo a la dosis de utilizada por Verdes et al, (2006) para la intoxicación crónica en bovinos, permaneciendo uno de los animales como testigo de los experimentos. Se le extrajeron muestras de sangre a los 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos y posterior centrifugación a 3000rpm en centrífuga clínica (marca Cavour VT-1675) para la obtención del suero de las muestras y conservación a -20°C hasta su procesamiento. Se repitió el procedimiento a los 10 días posteriores a la primera serie de experimentos.

Para los experimentos en ratas se les administró por boca a 12 ratas Wistar, extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* equivalente al peso- planta correspondiente al 1,0 % del Peso metabólico de las ratas, dejándose dos como animales testigo para determinar el tiempo 0, las cuales posteriormente fueron utilizadas en los experimentos *in vitro*. Fueron asignadas al azar los tiempos de extracción de sangre a razón de dos ratas por tiempo, para 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 minutos respectivamente procediendo de forma similar a lo mencionado previamente para la obtención del suero de los bovinos.

Para el análisis de presencia y concentración de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico en los sueros de los animales se realizó su análisis por HPLC de acuerdo a la metodología que resultó previamente mas sensible para los mismos.

6.2 Experimento 2: *Estudio in Vitro del transporte de los distintos componentes del extracto hidroalcohólico en tejido ruminal, reticular y omasal de bovinos e intestinal de ratas.*

Con los tejidos extraídos de 2 terneros se prepararon seis cámaras parabióticas usando tejidos de rumen, retículo y pliegues de tejido omasal. A las mismas se le agregó en el compartimiento mucoso 10,0 ml KRpb conteniendo un total 5,0 ml de liofilizado reconstituído en buffer KRpb de extracto hidroalcohólico. Se asignaron 2 cámaras para cada tipo de tejido por animal, a los 180 y 240 minutos después de la administración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense*, se procedió a la aspiración de 1,5 ml de la solución de la cámara serosal, y posteriormente se analizó por HPLC.

Del mismo modo, con tejido aislado de 2 ratas se prepararon cuatro cámaras parabióticas usando muestras de yeyuno aislado de ratas y se le agregó 10,0 ml KRPr conteniendo un total de 5,0 ml de liofilizado reconstituído en buffer KRPr. Se asignaron 2 cámaras para cada tiempo a los 180 y 240 minutos.

6.3. Experimento 3. *Transporte del extracto hidroalcohólico a través de tejidos ruminal, reticular y omasal de bovinos e intestinal de ratas tratados con azida de sodio (NaN₃).*

Al igual que en el diseño anterior, se usaron tejidos obtenidos de tubo digestivo de 2 terneros, preparándose 2 cámaras parabióticas para cada tejido, a los cuales se le agregó en el compartimiento mucoso 10,0 ml KRPb conteniendo un total 5,0 ml de liofilizado reconstituido en buffer KRPb de extracto hidroalcohólico mas 0,2% NaN₃ (inhibidor específico del transporte activo). Se extrajeron 1,5 ml de solución del compartimiento seroso a los 180 y 240 minutos después de la administración del extracto hidroalcohólico de hojas *Solanum bonariense* y posteriormente se analizaron por HPLC.

Se prepararon otras cuatro cámaras parabióticas con yeyuno aislado de ratas con el agregado de 10,0 ml KRPr conteniendo un total 5,0 ml de liofilizado reconstituido en buffer KRPr mas 0,2% de NaN₃ por cámara. Se extrajeron 1,5 ml de solución del lado seroso 180 y 240 minutos después de la administración del extracto, y se analizaron por HPLC.

6.4 Análisis de datos:

Se realizó el procesamiento de las TLC por densitometría de las corridas de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes partes de la planta, según la procedencia de la muestra (Agronomía o Veterinaria) mediante el análisis de imagen utilizando el software Total lab Versión 2005 (Nonlinear Dynamics Ltd, USA).

Métodos estadísticos utilizados:

La comparación entre la concentración presente en los diferentes extractos de frutos, hojas y flores, se realizó mediante el test de ANOVA. La comparación entre los diferentes extractos extraídos de diferentes locaciones (Veterinaria y Agronomía) se realizó mediante Test de t. En el análisis descriptivo se calculó la media de las variables incluyendo el intervalo de confianza correspondiente a un 95%.

Para los experimentos *in vivo* se realizó un ensayo clínico definiéndose dos grupos, uno con intervención del tóxico (extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*) y otro de control. Se recogió la información (área bajo la curva) de los componentes extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en el suero de los animales (bovinos y ratas), siendo una variable de tipo continua. En el análisis descriptivo se calculó la mediana de las variables, incluyendo el intervalo de confianza correspondiente a un 95%. En el análisis inferencial, se realizaron dos tests para comprobar la normalidad de distribución de la variable (test de Anderson) y la homocedasticidad de los grupos (test de Bartlett).

La concentración de los componentes extracto Hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en el suero de los animales, no tuvo una distribución normal y los grupos (intervención vs control) eran heterocedasticas. Bajo estas hipótesis realizamos el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico de todos los datos se realizó a través del software STATA10 y Epi Info 2003.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de los extractos hidroalcohólicos de partes de *Solanum bonariense*.

7.1.2. Caracterización de los extractos hidroalcohólicos mediante TLC y revelado con *Reactivo de Dragendorff*

En todos los extractos (frutos, flores y hojas) realizados se detectó presencia de alcaloides, presentando en todas las corridas la misma relación al frente ($R_f = 0.25$), nótese la presencia de la misma mancha (probablemente con los mismos componentes) en las 3 muestras corridas en forma simultánea y con una mayor expresión en el extracto proveniente de los frutos (Figura. 3). Se puede ver en la (Figura. 4), las corridas de los extractos hidroalcohólicos de hojas provenientes de distintos predios (VET: Veterinaria; AGR: Agronomía), notese que presenta la misma R_f .

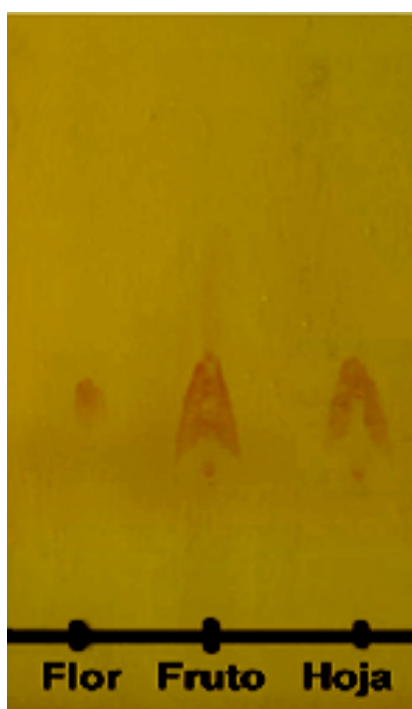


Figura 3. TLC de los diferentes extractos hidroalcohólicos de partes de *Solanum bonariense* (Flores, Frutos y Hojas).



Figura 4. TLC de los diferentes extractos hidroalcohólicos de hojas de *Solanum bonariense* de Facultad de Veterinaria y de Agronomía.

7.1. 3. Estudio densitométrico de los extractos hidroalcohólicos de flores, frutos y hojas de *Solanum bonariense*.

En el análisis densitométrico se obtuvieron los siguientes resultados indicados en el Cuadro N° VIII y en la (Figura 5.) Se observaron diferencias significativas en la cantidad de sustancia presente en cada uno de los extractos ($p \leq 0,0001$) mediante ANOVA. Se pudo comprobar que no existen diferencias significativas entre los diferentes extractos extraídos de diferentes locaciones (Veterinaria y Agronomía) mediante Test de t, como se observa en el Cuadro IX.

Cuadro N°VIII Resultados del análisis densitométrico de los cromatogramas de los extractos de las diferentes partes de la planta de *Solanum bonariense*

Cromatogramas	n	Media	Std error	p
Frutos	10	1,36E+06	49169,3	<0,0001
Hojas	10	532596	22463,3	<0,0001
Flores	11	219262	23677,7	<0,0001

Densitometría de las TLC mediante software Totallab 2005

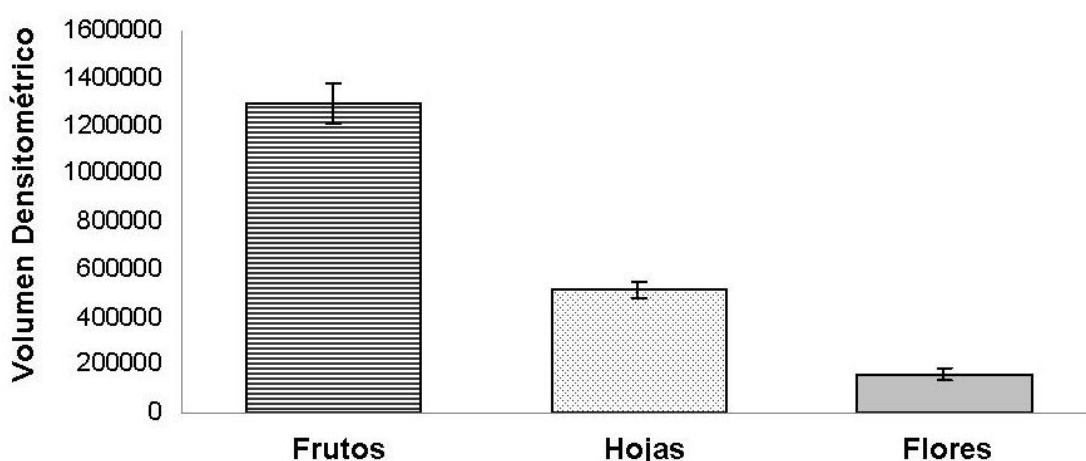


Figura 5. Variación de los alcaloides específicos de cromatogramas de los diferentes extractos hidroalcohólicos (frutos, hojas y flores) utilizando análisis densitométrico (Software Total Lab 2005).

Cuadro N° IX Resultados del análisis densitométrico de los cromatogramas de los extractos de las diferentes partes de la planta de *Solanum bonariense*

Extracto	Locación	n	Media	Std. error	p
Fruto	Agronomía	5	1,35E+06	77801,5	0,8689
	Veterinaria	5	1,36E+06	69186,9	
Hoja	Agronomía	5	555724	13663,9	0,351
	Veterinaria	5	509468	42621,1	
Flores	Agronomía	6	200617	39951,6	0,3151
	Veterinaria	6	248310	18737,7	

7.1.4. Estudio del espectro de Absorción del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense*.

Se encontró que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* presenta una absorción óptima entre los 250 y 290 nm, ya que por debajo de estas longitudes de onda los valores de absorción resultan muy inespecíficos, debido a la gran cantidad de compuestos que absorben entre 190 y 210 nm. (Figura 6).

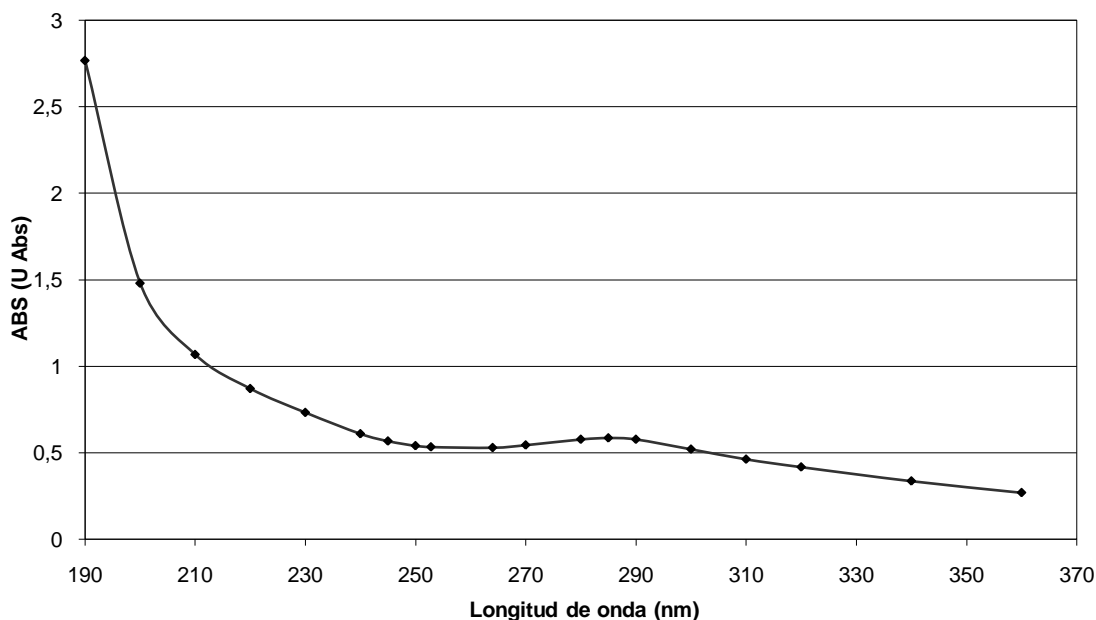


Figura 6. Variación de la absorbancia del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* a diferentes longitudes de onda. Nótese como se estabiliza la absorción entre 250 y 290 nm.

7.1.5. Caracterización del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* mediante HPLC.

Aparecieron 3 picos que resultan característicos debido a su repetibilidad en el extracto hidroalcohólico reconstituido en agua destilada (Figura 7) y Cuadro N° X, cuando se realizaron las corridas en las condiciones propuestas para identificar Cafeína, Aspirina y Acetaminofem (Fay, 1993) utilizando como fase móvil Agua: Metanol: Ácido Acético (proporción 69:28:3) a una longitud de onda 280 nm. También, en esta serie de experimentos se trabajó con longitudes de onda entre 210 y 290 nm, encontrándose que los mayores picos aparecen a una longitud de onda de 275 nm.

Cuadro N° X. Valores de las áreas bajo la curva de los cromatogramas del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* reconstituido en buffer KRPb.

Muestra	Tiempo Elusión (min.)	Área bajo Curva (U Abs/min.)	Tiempo Elusión (min.)	Área bajo Curva (U Abs/min.)	Tiempo Elusión (min.)	Área bajo Curva (UA/min.)
Extracto	1.432	29420142	1.877	35746204	2.496	152551776

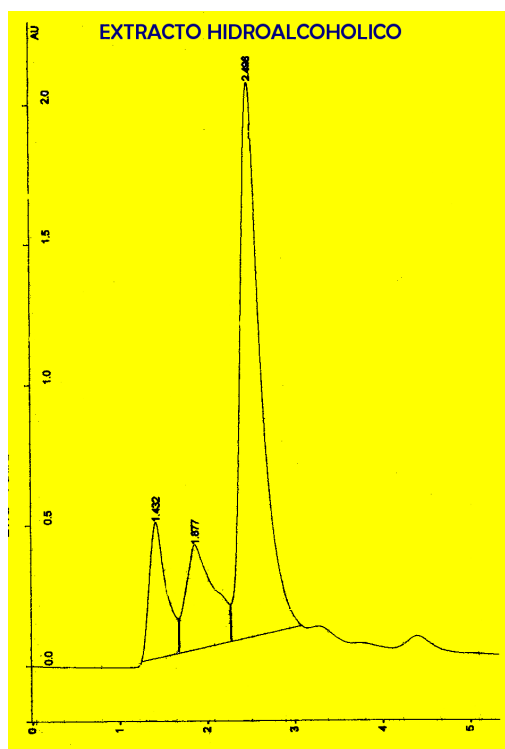


Figura 7. Cromatograma del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* utilizando las condiciones descritas por Fay (1993) a 275 nm.

7.1.6. Coeficiente de partición Octanol / Agua (KOW) del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* mediante HPLC.

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* reconstituido en agua destilada presentó un KOW = 0.04, lo cual revela una alta hidrofiliidad del mismo y una baja afinidad por los lípidos, se utilizaron en estos experimentos las mismas condiciones experimentales que las usadas en la caracterización del extracto.

7.2. Estudio *in Vivo* del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en terneros y en ratas.

7.2.1. Evaluación mediante TLC de sueros bovinos a los cuales se le suministró extracto hidroalcohólico *Solanum bonariense*.

No se pudo identificar mediante TLC la presencia de revelados de alcaloides en los sueros de los bovinos a los cuales previamente (180 y 210 minutos) se le había administrado extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* (Figura 8).



Figura 8. TLC de extracto hidroalcohólico de frutos, hojas y sueros bovinos a los 180 y 210 minutos pos administración de extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense*.

7.2.2. Evaluación mediante HPLC de sueros bovinos a los cuales se le suministró extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

En los sueros de los rumiantes aparecen 2 picos característicos en el suero a partir de los 30 minutos del suministro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense* y hasta los 180 minutos, como se muestra en las (Figuras 9,10 y 11) respectivamente, no existiendo la aparición de ningún pico en el animal testigo a lo largo de los 180 minutos. Se comprobó que existe un efecto tratamiento ($p \leq 0,0044$) comparándolo con el testigo mediante el test Kruskal-Wallis para dos grupos.

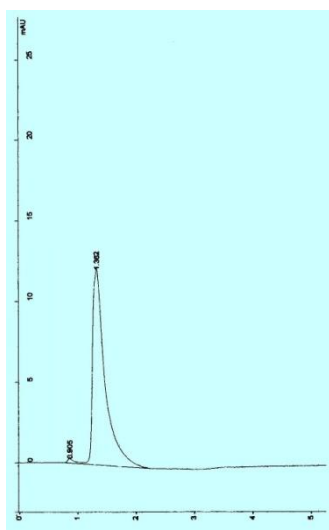


Figura 9. Suero de bovino a los 30 minutos posteriores al suministro de extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

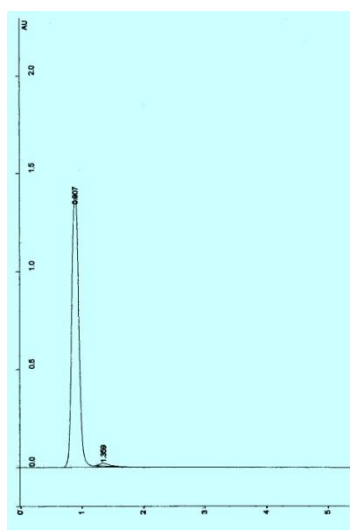


Figura 10. Suero de bovino a los 90 minutos posteriores al suministro de extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

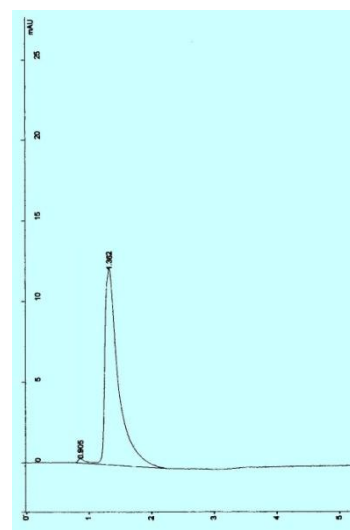


Figura 11. Suero de bovino a los 180 minutos posteriores al suministro de extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

7.2.3. Evaluación mediante HPLC de sueros ratas dosificados con *Solanum bonariense*.

En el suero de las ratas aparecieron de 2 a 3 picos diferentes a partir de los 30 minutos y hasta los 180 minutos como se muestra en las (Figuras 12,13 y 14) respectivamente. Del mismo modo que para la aparición en suero de bovinos de componentes del extracto hidroalcohólico, en suero de ratas existe un efecto tratamiento ($p \leq 0,046$) comparado con los animales sin tratar mediante el test Kruskal-Wallis. Existiendo diferencias significativas entre las curvas de sueros bovinos y de ratas como se indica en la (Figura 15), encontrándose un efecto especie ($p \leq 0,048$) mediante el test Kruskal-Wallis.

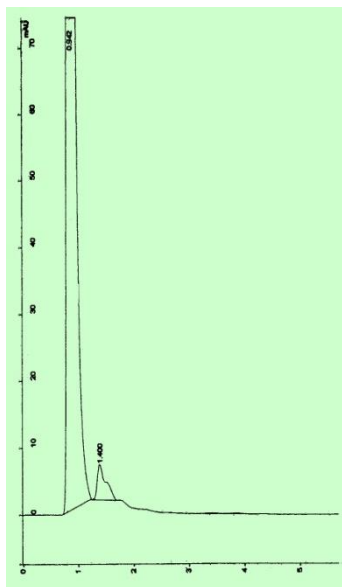


Figura 12. Suero de rata a los 30 minutos posteriores al suministro de extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

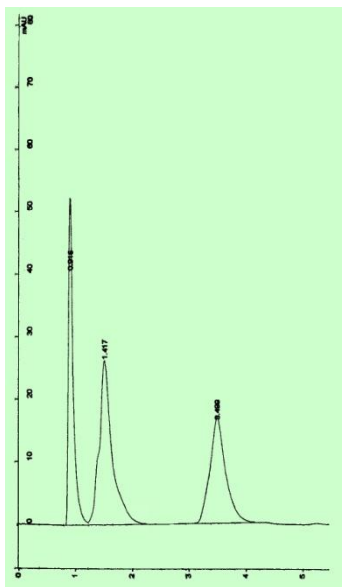


Figura 13. Suero de rata a los 90 minutos posteriores al suministro de extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

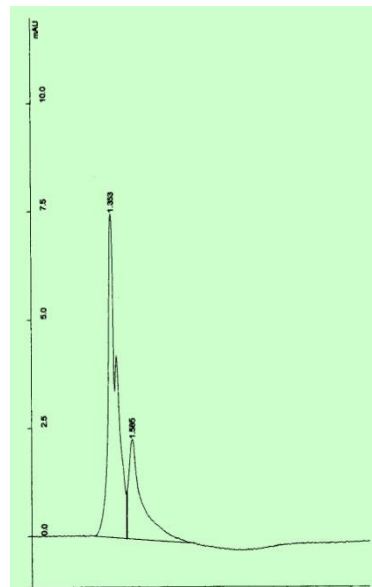


Figura 14. Suero de Rata a los 180 minutos posteriores al suministro de extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

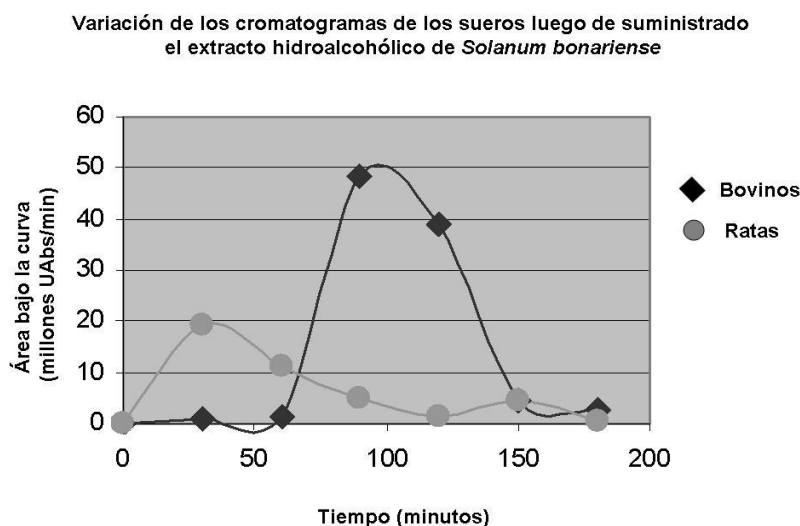


Figura 15. Grafico de variación de área bajo la curva en bovinos y ratas luego del suministro de extracto hidroalcohólico de *S. bonariense* a 1% del P Metab.

7.3. Estudio *in vitro* del transporte de los diferentes componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en terneros y ratas.

7.3.1. Evaluación mediante TLC del buffer serosal y mucosal de los experimentos *in vitro* a los 210 minutos de inoculado el extracto de hojas de *Solanum bonariense*.

Se identificó mediante TLC la presencia de revelados de alcaloides en el buffer de los compartimientos ruminal de la cámaras parabióticas (Ussing) de los experimentos *in vitro* a los cuales previamente (210 minutos) se le había administrado extracto hidroalcohólico de hojas de *Solanum bonariense*, por el contrario no se identificó la presencia de revelados de estos mismos u otros alcaloides en el compartimiento serosal de las cámaras parabióticas en ambas especies estudiadas (Figura 16).

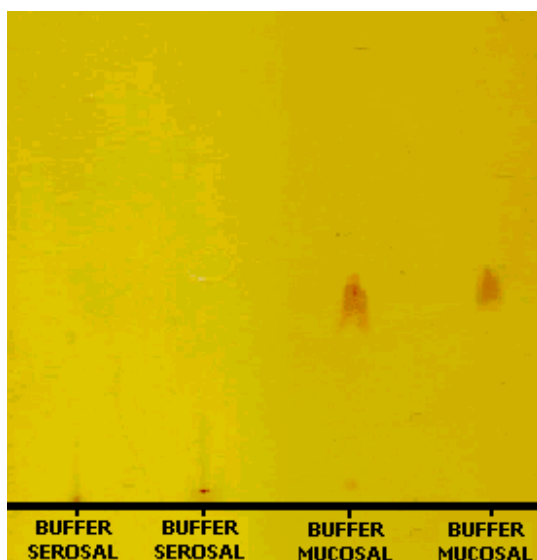


Figura 16. TLC de los compartimientos de las cámaras parabióticas con extractos hidroalcohólicos de hoja de *Solanum bonariense* a los 210 minutos.

7.3.2. Evaluación mediante HPLC del buffer serosal de los experimentos *in vitro* a los 180 y 210 minutos luego de administrado el extracto de hojas de *Solanum bonariense*.

Se constató la aparición de picos característicos en el compartimiento serosal de las cámaras parabióticas preparadas con tejidos ruminal, reticular e intestinal de rata a los 180 y 240 minutos, en cambio no pudo determinarse la presencia de ningún pico en las cámaras con preparaciones de tejido omasal, como se puede ver en las (Figuras 17, 18 y 19), nótese que en la (Figura 19) la unidad de medida es mil veces menor que en los cromatogramas de las (Figuras 17 y 18).

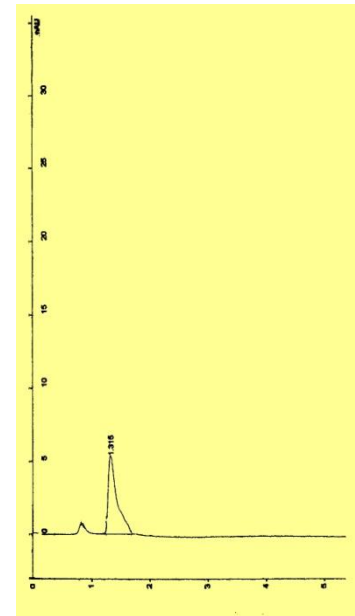
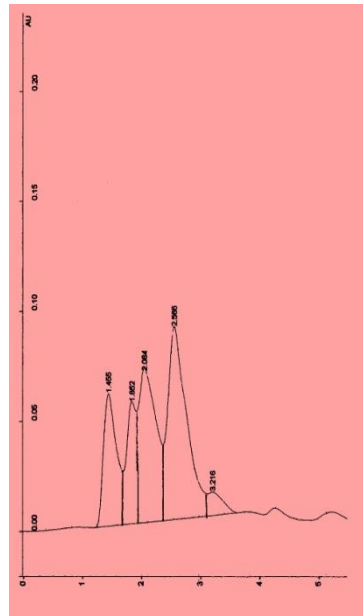
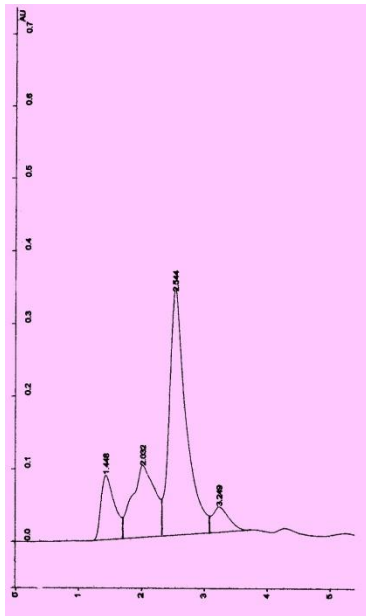


Figura 17. Cromatograma de Buffer Serosal de Cámara Parabiótica preparada con tejido ruminal a los 180 minutos (AU en función del tiempo)

Figura 18. Cromatograma de Buffer Serosal de Cámara Parabiótica con tejido reticular a los 240 minutos (AU en función del tiempo)

Figura 19. Cromatograma de Buffer Serosal de Cámara Parabiótica con tejido intestinal ratas a los 180 minutos. (mAU en función del tiempo)

No se encontraron diferencias significativas por efecto del tiempo, aunque se encontraron diferencias significativas en la presencia de componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* por un efecto tejido, entre rumen, retículo, omaso e intestino ($p \leq 0,0025$) mediante el test Kruskal-Wallis.

Es importante destacar que en el compartimiento serosal de tejido omasal no se identificó la presencia de ningún pico en los cromatogramas, lo que nos indicaría que este preestomago no tiene ninguna implicancia en la absorción del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

En cuanto a los diferentes compartimentos, se puede decir que presentaron diferencias entre los mismos, siendo el compartimiento serosal ruminal el que presentó un área bajo la curva mayor al tiempo de 180 y 240 minutos respectivamente, seguido del compartimiento reticular y posteriormente los compartimentos con tejido intestinal de rata, como se observa en la (Figura 20.)

Análisis del Buffer Serosal de las cámaras parabióticas con diferentes tejidos

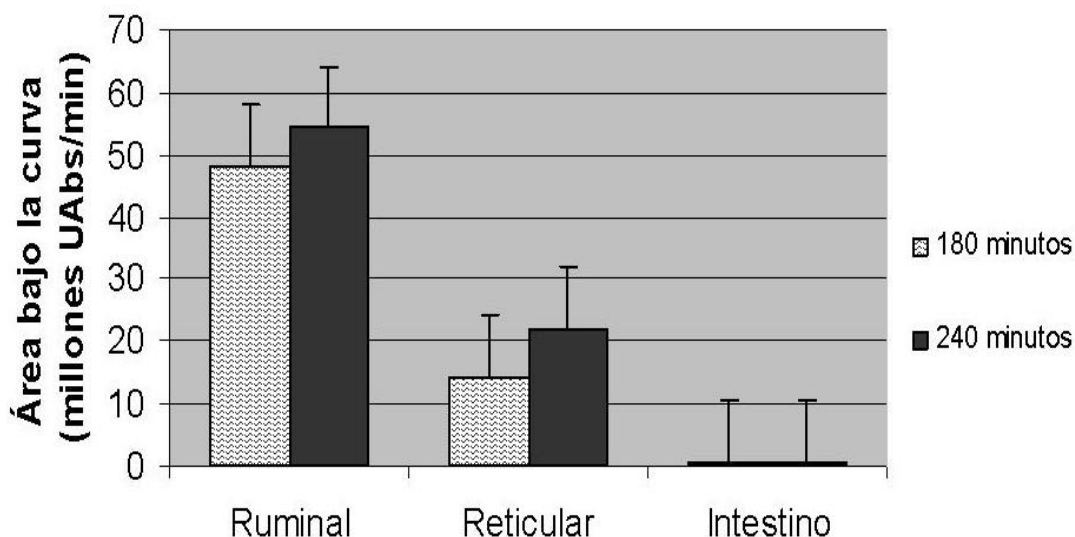


Figura 20. Grafico de variación de la cantidad de componentes del extracto hidroalcohólico *Solanum bonariense* en el compartimiento serosal en tejido aislado de rumen, retículo e intestino usando cámaras parabióticas.

7.4. Determinación del tipo de transporte involucrado en la absorción del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

En los experimentos con azida de sodio existe una disminución en el área bajo la curva de todas las preparaciones de tejidos, además de una disminución en el número de picos en algunos casos como se puede ver en las (Figuras 21, 22 y 23.)

Existen diferencias significativas en la cantidad encontrada en el compartimiento serosal para los tejidos ruminal con y sin azida de sodio ($p \leq 0,002$), del mismo modo para el tejido reticular con y sin azida de sodio ($p \leq 0,002$) mediante el test Kruskal-Wallis. Además se observaron diferencias significativas cuando interponemos tejido intestinal de rata con y sin azida ($p \leq 0,001$) mediante ANOVA. También disminuyó el área bajo la curva del pico característico cuando se agregó azida de sodio 0,2 % al medio para ambos tejidos reticular y ruminal respectivamente (Figuras 24, 25, 26, 27, 28 y 29).

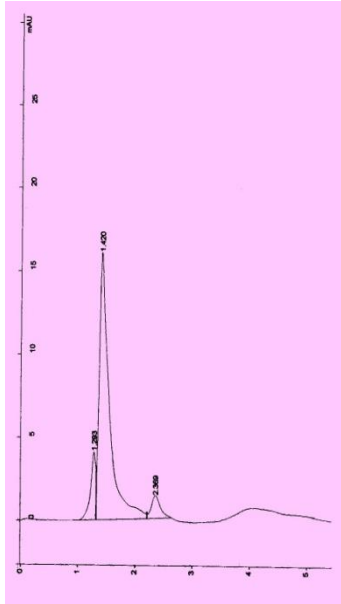


Figura 21. Cromatograma de Buffer Serosal de Cámara Parabiótica preparada con tejido ruminal y 0,2 % NaN_3 a los 180 minutos.

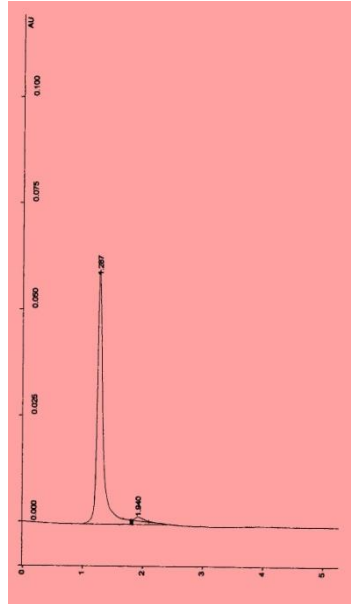


Figura 22. Cromatograma de Buffer Serosal de Cámara Parabiótica preparada con tejido reticular y 0,2 % NaN_3 a los 240 minutos.

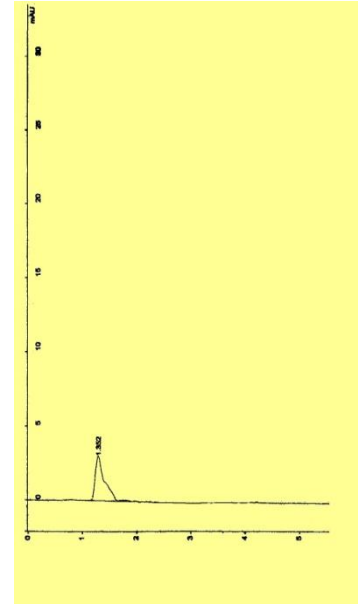


Figura 23. Cromatograma de Buffer Serosal de Cámara preparada con intestino de ratas y 0,2 % NaN_3 a los 180 minutos, nótese que la unidad de medida es mil veces menor que para los otros experimentos.

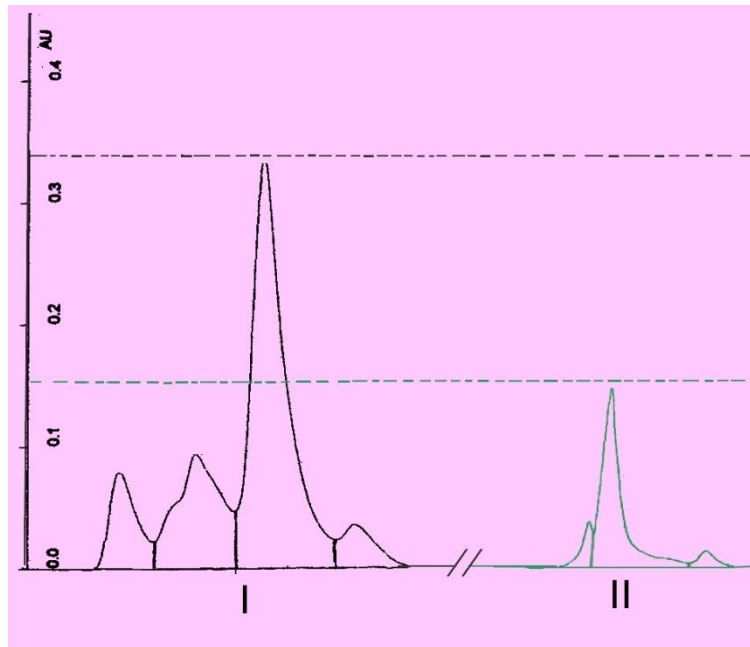


Figura 24. Comparación de los cromatogramas del Buffer Serosal de Cámara Parabiótica preparada con tejido ruminal a los 180 minutos I (negra). Nótese la disminución del área bajo la curva al mismo tiempo cuando se le suministró 0,2 % NaN_3 al buffer mucosal II (verde).

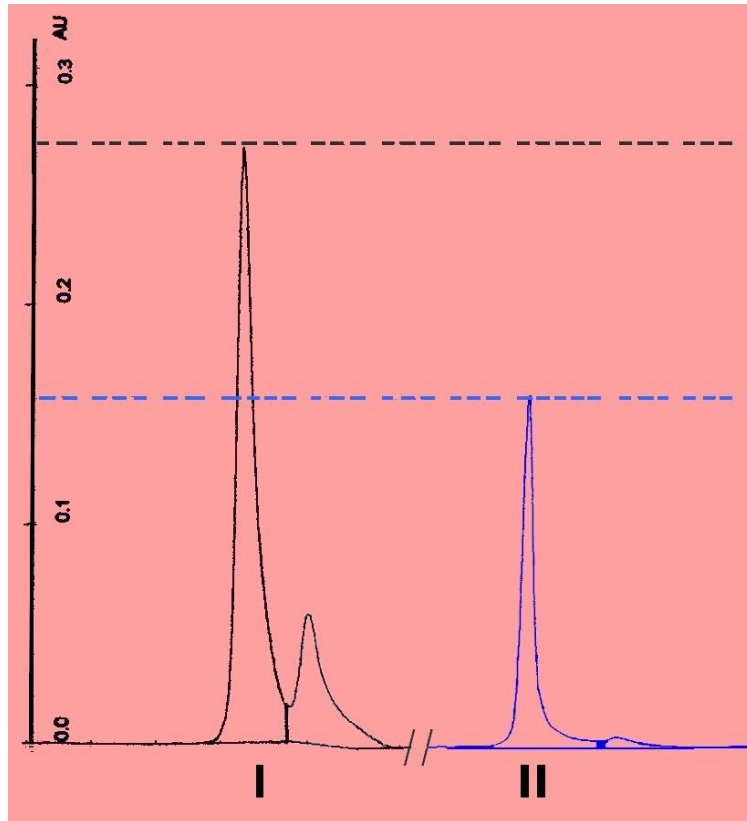


Figura 25. Comparación de los Cromatogramas Buffer Serosal de Cámara Parabiótica preparada con tejido reticular I (negra) y II (azul) con 0,2 % NaN_3 a los 240 minutos.

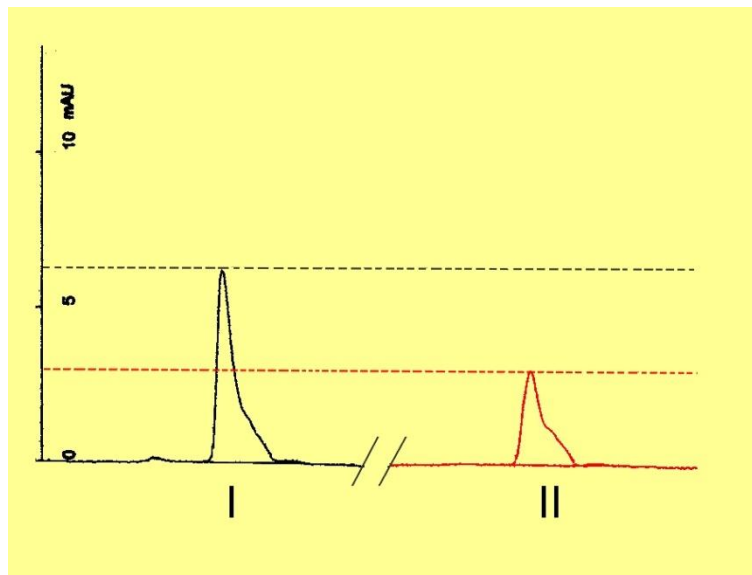


Figura 26. Comparación de los Cromatogramas Buffer Serosal de Cámara Parabiótica preparada con tejido intestinal ratas I (negra) y II (rojo) con 0,2 % NaN_3 a los 180 minutos.

Análisis del Buffer Serosal en cámaras parabióticas con tejido Ruminal

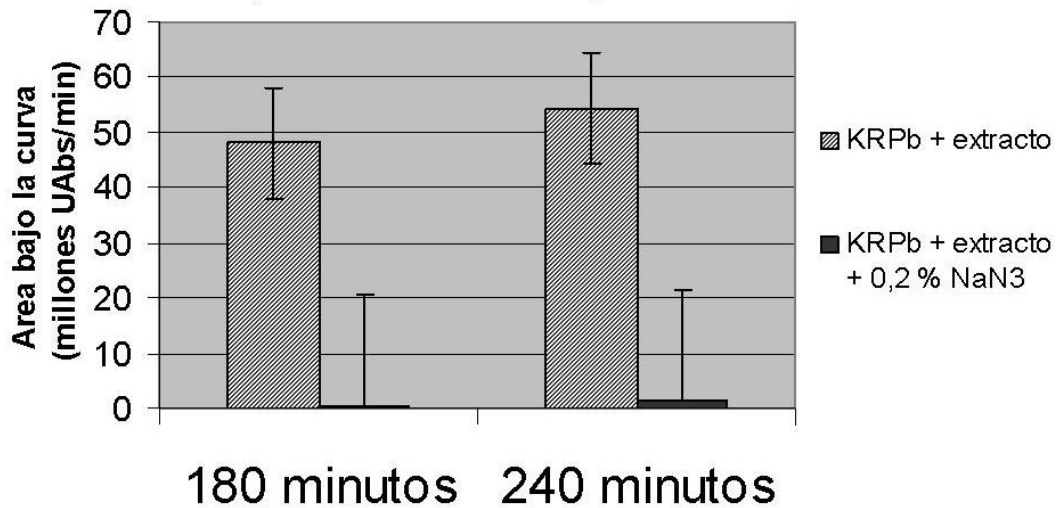


Figura 27. Variación de la cantidad de componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en el compartimento serosal cuando se le agrega 0,2 % de NaN_3 a la cámara parabióticas montada con tejido ruminal a los 180 y 240 minutos.

Análisis del Buffer Serosal en cámaras parabióticas con tejido Reticular

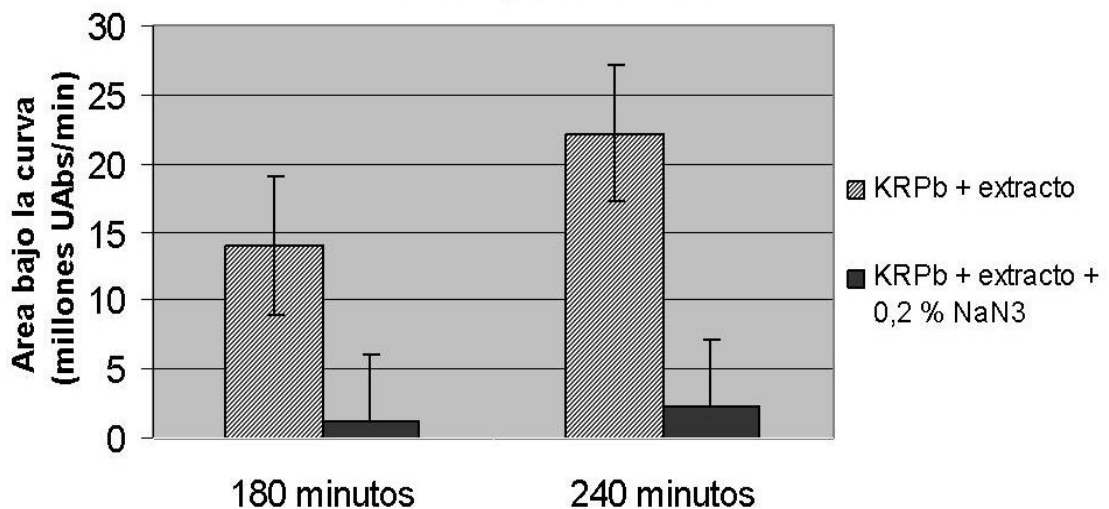


Figura 28. Variación de la cantidad de componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en el compartimento serosal cuando se le agrega 0,2 % de NaN_3 a la cámara parabióticas montada con tejido reticular a los 180 y 240 minutos.

Análisis de Buffer Serosal en cámaras con tejido Intestinal de ratas

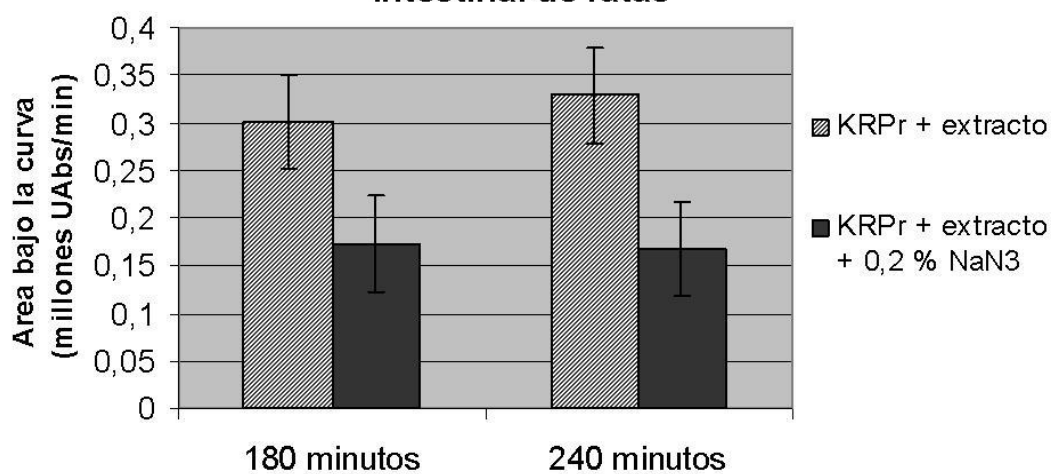


Figura 29. Variación de la cantidad de componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* en el compartimiento serosal cuando se le agrega 0,2 % de NaN_3 a la cámara parabólica montada con tejido intestinal de rata a los 180 y 240 minutos.

8. DISCUSIÓN

Al igual que para otras especies de *Solanum* (Hiroyuki et al, 1997; Mosquera et al, 2004; Friedman, 2004) se pudo comprobar la presencia de alcaloides característicos en el extracto hidroalcohólico de todas las partes de la planta (hojas, flores y frutos) de *Solanum bonariense* utilizando TLC y revelado con Drangedorff presentando las misma Rf que el extracto hidroalcohólico de hojas, previamente reportado por nuestro grupo (Verdes et al, 2000). Por el contrario Higa et al (2007) solamente encontraron flavonoides glicosídicos en hojas de *Solanum fastigiatum* usando la misma técnica cromatográfica, siendo esta una especie de solanáceas muy emparentada con *Solanum bonariense*.

A diferencia de lo visto en nuestro caso, en algunos otros estudios se han observado diferencias en el tipo y la concentración de glicoalcaloides de especímenes de otra solanácea (*Solanum commersonii*) obtenidos de diferentes locaciones del sur del Uruguay (Pianzzola et al, 2005; Siri et al, 2004) o de dos regiones diferentes del mundo (*Solanum torvum Sw*) en Chiapas (México) e India, estas diferencias pueden ser debidas posiblemente a diferentes condiciones atmosféricas o del microambiente de la planta (Pérez-Amador et al, 2007) o a cambios estacionales y diarios, presumiblemente relacionados con la temperatura ambiente (Vázquez, 1997).

Se pudo constatar mediante TLC y densitometría que todos los extractos obtenidos de diferentes partes de la planta (flores, hojas y frutos) presentan el mismo alcaloide específico y que se distribuyen de forma diferencial en los diferentes tejidos de la planta, tal como ocurre en otros tipos de solanáceas (Vázquez, 1997).

Encontramos que los frutos concentran la mayor cantidad de estas sustancias por unidad de peso, conteniendo a razón de 2,5 veces más sustancias que las hojas, éstas últimas a su vez concentran estos compuestos secundarios a razón de 3 veces más que lo que lo hacen las flores de la misma planta, en contraposición (Kozukue et al. 1987; Friedman et al 1998; Vázquez, 1997) encontraron una mayor concentración de glicoalcaloides del *Solanum tuberosum* en brotes, seguido por las flores y posteriormente sus frutos y hojas verdes. Cabe resaltar que en nuestro trabajo se realizaron los extractos con frutos maduros y que la concentración de estos metabolitos secundarios podría estar aumentados aún más en el fruto verde o en crecimiento (Vázquez, 1997) como sucede para el caso de *Solanum nigrum* (Cooper y Johnson, 1984), aunque se ha demostrado que los glicoalcaloides del tomate están más concentrados en hojas verdes que en hojas maduras, sin embargo cuando se expresa en peso seco la concentración parece ser similar (Friedman et al, 1998).

Esto confirma lo visto por otros autores en cuanto a que esta distribución variable de los compuestos secundarios en los diferentes tejidos vegetales podría ser una estrategia de defensa utilizada frecuentemente por muchas plantas, dependiendo la redistribución de estos metabolitos del valor específico que posea para la planta y de acuerdo al desarrollo fenológico de la misma (Ramos et al 1998).

Es importante destacar que el *Solanum bonariense* fructifica desde abril a junio (Chiarini et al, 2007) siendo en esta época del año de acuerdo a nuestros resultados en la que podría haber mayores niveles de alcaloides en la planta (particularmente en los frutos) y por tanto podría existir en otoño un mayor riesgo de intoxicación, ya que por unidad de planta habría una mayor concentración de sustancia activa. Pese a que no se han encontrado intoxicaciones en el hombre por esta planta en el estado de Río Grande do Sul, se comercializan productos a base de *Jurubeba* (extracto hidroalcohólico) para las dolencias hepáticas y esplénicas que según la Farmacopea Brasileira 1 (1929) debería de ser *Solanum paniculatum*, pero

las preparaciones hecha en ese estado son en base a *Solanum fastigiatum Willd* e inclusive *Solanum bonariense* que son morfológicamente semejantes (Mentz et al, 1989) y que algunos autores clasifican como la misma (Chiarini et al, 2007).

Mediante la técnicas utilizadas en nuestro trabajo, no se pudo confirmar la presencia de alcaloides en los sueros de bovinos y ratas a los cuales se les habían suministrado previamente los extractos hidroalcohólicos de hojas, así como tampoco en el buffer de los compartimientos serosal en los experimentos *in Vitro* para todos los tejidos. En este caso, podría resultar una alternativa interesante explorar el desarrollo de TLC asociada a inmunotinción mediante anticuerpo monoclonales como los usados en el análisis de alcaloide del *Solanum khasiamon* para la determinación de estas sustancias en el suero o plasma de animales por su altísima sensibilidad (Hiroyuki et al, 1997), aunque para ello se deben elucidar estructuralmente los alcaloides involucrados en nuestro caso.

La identificación de picos característicos en el extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* utilizando como herramienta la HPLC con la condiciones experimentales propuestas para la identificación de otros alcaloides previamente caracterizados (como la cafeína, aspirina y acetaminofem) coincide con los planteado por Fay et al (1993), y nos permite decir que esta metodología resulta especialmente sensible para identificar alcaloides también en nuestras condiciones experimentales, brindándonos así una herramienta para futuros estudios experimentales en modelos *in Vitro* para identificar picos característicos en el extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*. Estos resultados refuerzan la idea planteada por Verdes et al (2000) de que nos encontramos ante la presencia de uno o más alcaloides característicos de esta solanácea.

Esta metodología antes mencionada también resultó de utilidad en modelos *in Vivo*, pero esta vez partiendo de muestras de sueros de bovinos y ratas a los que previamente se le había suministrado extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*, así se pudo evaluar la presencia de picos característicos en los sueros ambas especies a partir de los 30 minutos y a lo largo de todo el experimento, al igual que lo observado para el caso de alcaloides de *Nicotiana tabacum* (nicotina) administrados por vía oral en humanos, aparecen picos a partir de los 30 minutos y se mantienen hasta las 2 horas donde empieza a declinar (Hukkanen et al, 2005). Por el contrario, la identificación de picos característicos en el suero de los animales en nuestras condiciones experimentales durante varias horas no coincide con lo planteado por Hill et al (2001) para el caso de los alcaloides del ergot, en este caso desaparecen rápidamente del torrente sanguíneo de los animales tratados debido al alto clearance renal de estos alcaloides, cuya vida media es de 24 minutos en ovejas, 32 minutos en cabras y 2 horas en el hombre (Shappell et al, 2005).

En nuestras condiciones experimentales, se confirmaron diferencias cualitativas de los perfiles cromatográficos entre los sueros de bovinos y ratas, apareciendo en bovinos solo 2 picos característicos a lo largo de los 180 minutos del experimento, mientras que en los sueros de ratas pueden aparecer hasta 3 picos de elusión diferentes para los mismos tiempos utilizados en los experimentos con bovinos.

Cabe destacar que existe una variación en los niveles detectados en los sueros a medida que transcurre el tiempo post-suministro del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*, siendo máximo el nivel detectado en ratas hasta los 60 minutos, mientras que para el caso del suero de los bovinos, el nivel máximo se observa a

partir de los 90 y hasta los 150 minutos. Estas variaciones detectadas entre diferentes especies animales para un mismo alcaloide han sido extensamente estudiadas en las solanáceas, es así que luego del suministro de soladinina y α -chaconina a humanos se encuentran niveles detectables en suero a las 4 a 8 horas (Harvey et al, 1985), por el contrario en hámsters dorados se encuentran picos de α -chaconina a partir de las 12 horas y hasta las 168 horas después de la dosificación (Alozie et al, 1979), de manera similar en ratones se encuentran picos en suero luego de las 14 horas y hasta las 120 horas posteriores al suministro (Sharma et al, 1983).

Estas diferencias pueden ser atribuidas a la posible existencia de un retraso en el proceso de absorción de los compuestos presentes en el extracto hidroalcohólico disueltos en el contenido total de los preestómagos y a una mayor absorción del extracto cuando es expuesto en poco volumen directamente a muestras del sistema digestivo de los bovinos. Estos datos, confirman nuestra hipótesis de que las sustancias no sean absorbidas de manera similar en bovinos o que sean hidrolizadas (al menos parcialmente) en el tubo digestivo y/o en el suero de las ratas. Este tipo de mecanismos dentro del suero de los roedores a través de enzimas hidrolíticas que se encargarían de la degradación de dichos componentes, ha sido observado en el suero de los conejos para la hiosciamina y hemotropina en los cobayos (Alexanders et al, 2007). Westendorf et al. (1992) también encontraron que el suministro de alcaloides del ergot previamente incubados con fluido ruminal a ratas, no provoca ninguna alteración clínica probablemente debido a una degradación de los compuestos tóxicos en este caso.

Esta variación en el perfil cromatográfico entre rumiantes y roedores también podría deberse a un cambio en algunos de los componentes del extracto hidroalcohólico dentro del compartimiento ruminal por acción de las bacterias ruminales o por las condiciones reductoras presentes en el mismo (Carlson et al, 1984), cambiando de esta forma la estructura química del compuesto y haciéndolo más tóxico, similar a lo observado en el caso de los alcaloides del ergot donde la ergovalina es degradada a ácido lisérgico por acción de los microorganismos ruminales y posteriormente estos metabolitos son absorbidos a través de la pared ruminal (De Lorme et al, 2007).

Estas características observadas en otros casos, pueden hacer que en el rumen se produzca una neoformación de compuestos tóxicos, aunque también existen otros trabajos que confirman que el rumen es incapaz de digerir varios tipos de alcaloides y de absorberlos sin ninguna variación en la composición de los mismos (Aguiar et al, 2005). Otro aspecto no menos importante es la existencia de una diferencia marcada en el perfil de aparición de los componentes del extracto hidroalcohólico en el suero de los bovinos debido posiblemente al retardo existente a nivel de los preestómagos, posibilitando así una mayor absorción del mismo a lo largo del tiempo y un posible cambio en su composición por simple degradación química sin mediación de procesos hidrolíticos.

El potencial de transporte *in vitro* de los componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* ocurrió en todos los tejidos menos en el tejido omasal, pero con diferentes rangos de absorción para cada tipo de tejido. Estos datos sugieren que los tejidos ruminales y reticulares presentaron una mayor capacidad de transporte a razón de 165 a 67 veces mayores respectivamente que el tejido intestinal de ratas, En cambio, Hill et al (2001) encontraron que el rumen presentaba una absorción de alcaloides de ergot a razón de 6 veces mayor que la del retículo y 2,5 veces más que la del omaso. Estas diferencias observadas entre los

tejidos de bovinos y de ratas, probablemente se deban a una amplificación del área de exposición en la cámaras parabióticas por la presencia de papilas en la mucosa de rumen y retículo que aumentarían hasta $614.4 \text{ mm}^2/\text{cm}^2$ (Reynolds et al, 2004). Similares son las conclusiones de Hukkanen et al (2005), quienes plantean que la absorción de nicotina es pobre en el estomago y alta en intestino de humanos, posiblemente por una mayor área de exposición.

Por el contrario en el compartimiento serosal del tejido omasal no se obtuvo ningún componente del extracto hidroalcohólico, sugiriéndose que este preestomago no tiene ninguna implicancia en la absorción de este tipo de compuestos, que por el contrario es un importante sitio de absorción de alcaloides ergot llegando a ser muy superior a la absorción del retículo (Hill et al, 2001). Cabe resaltar que los perfiles de los cromatogramas del buffer serosal son diferentes a los encontrados en los sueros sanguíneos de los animales, presentando los compartimientos serosal de bovinos hasta 5 picos diferentes en contraposición a los 2 picos encontrados en el suero sanguíneo, mientras que en ratas se constató la presencia de un solo pico en el buffer serosal a lo largo de los 240 minutos que duraron los experimentos *in vitro*. En este experimento se pudo comprobar que el rumen es un importante sitio de absorción y de cambio estructural a nivel de los componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* al igual que sucede para los alcaloides del ergot (Westendorf et al, 1992; Hill et al, 2001).

En los experimentos en los cuales se buscó elucidar los mecanismos involucrados en el transporte de los componentes del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*, se determinó que existe un mecanismo muy importante mediado por energía ya que en los experimentos en los que se adicionó azida de sodio 0,2 % al medio se produjo una disminución de la absorción de compuestos a razón de 47 veces para el rumen y de 9 veces para el retículo, estos datos son similares a los obtenidos para el caso de los alcaloides del ergot (Hill et al, 2001).

Para el caso de los experimentos *in vitro* con intestino delgado de rata se observaron diferencias significativas de absorción en el intestino aislado de ratas con azida de sodio con una disminución a razón de 1,9 veces, lo que indicaría que solo una pequeña parte del mecanismo involucrado en la absorción de componentes de extracto hidroalcohólico en el intestino de ratas estaría mediado por energía, siendo el transporte pasivo el dominante en la absorción de los componente del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.

La reducción del transporte de componentes del extracto hidroalcohólico por los tejidos tratados con azida de sodio sugiere que el tejido debe de estar viable para que eso suceda, por lo que parte del mecanismo que estaría involucrado en el pasaje de estos componentes, estaría mediado por consumo de energía, o sea transporte activo, ya que la azida de sodio inhibe el complejo IV de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria disminuyendo así la cantidad de ATP disponible para realizar dicho trabajo. No sólo significa que la célula debe estar viva, sino que seguramente además en dicho transporte debe participar al menos alguna macromolécula especializada en el transporte de los alcaloides y probablemente hasta un receptor específico que los reconozca. También puede ser que los alcaloides sean similares a otras moléculas que son transportadas normalmente a través de las membranas y los alcaloides sean confundidos o compitan con las otras moléculas para ser transportadas.

Cabe resaltar que muchas veces los mecanismos de transporte para alcaloides de plantas utilizan la difusión pasiva o mediada por energía, como es el caso del transporte intestinal *in vitro* de 4 alcaloides indoloquinazolines de *Evodiae fructus*

(Wei Yang et al, 2009) en el cual tres de ellos se realizan por difusión pasiva, mientras que el alcaloide *Wuzhuyurutine B* se transporta activamente por un mecanismo de Eflujos, en el cual la proteína MRDP₂ juega un rol protagónico. Estas proteínas MRDP₂ pertenecen a la familia ABC consideradas transportadores unidireccionales a través de la membrana (Saurin et al, 1999). Los sustratos de estas enzimas son extraordinariamente variados, desde pequeñas moléculas hasta macromoléculas, estas proteínas purificadas fijan e hidrolizan ATP para el movimiento de sustratos por un mecanismo aún no bien dilucidado (Deferme et al, 2000; Scheffer et al, 2000).

El extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* presenta un altísima hidrosolubilidad siendo el log KOW= -1,44 similar al encontrado para los alcaloides de *Paeoniflor spp.*, los que presentan una baja lipofilicidad con un log KOW = -2,88 absorbiéndose a través de un transporte activo por eflujos en la membrana apical del enterocito (Qiu Liu et al, 2006). Del mismo modo, las calisteginas son absorbidas desde el intestino hasta la circulación posiblemente por transporte activo o facilitado debido a su baja lipofilicidad (Cordell, 2007). En cambio para los casos de la solanina y la tomatidina presentes en muchos miembros de la familia solanácea se ha observado que pueden formar complejos con el colesterol, presentando así una alta lipofilicidad (Wink, 2003). Esta característica de baja liposolubilidad del extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense* determinaría una baja absorción por difusión simple a través de los tejidos e indicaría que esta sustancia requiere de un transportador específico para atravesar los mismos, resultando que este transportador debería expresarse mucho más en las mucosas del rumen y el retículo, siendo este hallazgo una de las posibles causas de la especificidad de la intoxicación en rumiantes y de la imposibilidad de intoxicar experimentalmente a los roedores por vía oral.

De futuro este trabajo debería orientarse a demostrar la existencia y funcionalidad de estos mecanismos específicos de transporte a través del uso de herramientas moleculares específicas como prodrían ser entre otras: los inhibidores específicos del sistema ABC (Qiu Liu et al, 2006; Emi et al, 1998), las P-glicoproteínas (ciclosporina A, Verapamil, Sinomenine) o los MRDP (MK-571, Leucotrieno) ya que por las características del extracto y su sensibilidad a la azida de sodio no cabe duda que estamos ante un transporte mediado por este tipo de proteínas.

En este estudio se observó una elevada concentración de alcaloides en el extracto de frutos maduros de *Solanum bonariense*, pero no se cuantificó el fruto verde, que como se sugiere para otras solanáceas es un importante concentrador de metabolitos secundarios, así siguiendo esta línea de trabajo, de futuro podríamos realizar un análisis de riesgo sobre la época de año donde habría mayor peligro de que ocurra esta intoxicación. En el futuro con el estudio de los mecanismos de transporte de los alcaloides del *Solanum bonariense* se podría evaluar la utilización de adsorbentes en la alimentación para evitar o disminuir la absorción en el tracto gastrointestinal de los rumiantes, como ocurre para el caso de otros alcaloides y micotoxinas. Entre los aditivos más usados en bovinos tenemos preparados de levaduras de pared ruminal (Merrill et al, 2007), minerales como bentonitas (Chansiripornchai y Fink-Gremmels, 2004) o Hidrato de Sodio Cálculo aluminosilicato (Chestnut et al, 1992), complejos de carbohidratos indigestibles como Glucomannans o mannanoligosacáridos (Huwig et al, 2001; Binder, 2007).

Akay et al (2003) encontraron que Glucomannans aumenta la excreción de alcaloides ergot, aunque Bohnert y Merrill (2007) no han podido confirmar estos

datos y muy por el contrario Gunter et al (2009) no encontraron una disminución de los niveles sanguíneos de estos ergot cuando se le suministraban a los animales estos aditivos.

La identificación y caracterización de transportadores o receptores de los alcaloides específicos del *Solanum bonariense* en los tejidos digestivos puede ser una futura línea de trabajo a los efectos de encontrar sustancias capaces de inhibir los procesos absorbivos de estas sustancias a nivel ruminal, y prevenir la intoxicación observada naturalmente en bovinos en pastoreo en Uruguay.

9. CONCLUSIONES

- a) El *Solanum bonariense* presenta alcaloides específicos en todos sus tejidos pero expresados diferencialmente, siendo su contenido más alto en los frutos que en las hojas y en estas más altos que en las flores.
- b) Se sugiere una cierta estacionalidad en la expresión de estas sustancias dependiendo del estado vegetativo de la planta, pudiendo ser potencialmente más tóxica durante el otoño, estación en que se produce la fructificación.
- c) La Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) resultó ser una buena herramienta para la detección de sustancias en el extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.
- d) La relativa resistencia de los roedores a la intoxicación por vía digestiva podría deberse a la baja absorción del intestino delgado de la rata de las sustancias presentes en el extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.
- e) En el bovino hay una alta absorción en el tejido ruminal y reticular, siendo varias veces más elevada en el rumen que en retículo. Además, esta elevada absorción es en parte mediada por transporte activo. En el omaso no se produce absorción de los componentes presentes en el extracto hidroalcohólico de *Solanum bonariense*.
- f) Puede existir un transportador específico de estos alcaloides en el intestino de los bovinos ausente en el intestino de la rata.
- g) La HPLC podría ser utilizada para identificar la presencia de los alcaloides en los bovinos a campo que están sufriendo de esta intoxicación crónica y que aún no presentan sintomatología característica de dicha intoxicación.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Abdoun K, Stumpff F, Wolf K, Martens H (2005). Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289: 508-520.
- 2 Aguiar R, Wink M (2005). Do Naive Ruminant degrade alkaloids in the rumen?. *Journal of Chemical Ecology*. 31 (4)761:787.
- 3 Ahmad A, Kawy M, Nebsen M (2002). First derivative ratio spectrophotometric, HPTLC-densitometric, and HPLC determination of nicergoline in presence of its hydrolysis: induced degradation product. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. Vol. 30(3):524.
- 4 Akay V, Foley M, Jackson J, Kudupoje M, Dawson K (2003). Supplementation of FEB-200™ to alleviate endophyte toxicosis in steers. *J. Anim. Sci.* 81 (1):229
- 5 Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi J, Dogliotti E, Di Domenico A, Fernández M, Fürst P, Gremmels J, Galli L, Grandjean P, Gzyl J, Heinemeyer G, Johansson N, Mutti A, Schlatter J, Van Leeuwen R, Van Peteghem C, Verger P (2007). Opinion Of The Scientific Panel On Contaminants In The Food Chain On A Request From The European Commission Related To Pyrrolizidine Alkaloids As Undesirable Substances In Animal Feed. *The EFSA Journal* 447: 1-50
- 6 Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi J, Dogliotti E, Di Domenico A, Fernández M, Fürst P, Gremmels J, Galli L, Grandjean P, Gzyl J, Heinemeyer G, Johansson N, Mutti A, Schlatter J, van Leeuwen R, Van Peteghem C, Verger P (2008). Tropane alkaloids (from *Datura* sp.) as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal* 691:1-55
- 7 Alozie S, Sharma R, Salunkhe D (1979). Physiological disposition, subcellular distribution and tissue binding of alpha-chaconine (3H). *J. Food Safety* 1: 257-273.
- 8 Araujo O y Vergara-Lopez J (2007). Propiedades Físicas y Química del Rumen. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15 (1):133-140
- 9 Baker D, Keeler R, Gaffield W (1989). Pathology in hamsters administered Solanum plant species that contain steroidal alkaloids. *Toxicol* 27(12):1331-1337.
- 10 Berglund J, Riegler M, Zolotarevsky Y, Wenzl E, Turner E (2001). Regulation of human jejunal transmucosal resistance and MLC phosphorylation by Na⁺-glucose cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:1487-1493.
- 11 Bernheim F y Bernheim M (1938). The hydrolysis of homatropine and atropine by various tissues. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 64 (2):209-216.
- 12 Binder Eva (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology* 133:149-166.
- 13 Bodeker D, Winkler A, Holler H (1990). Ammonia absorption from the isolated reticulo-rumen of sheep. *Experimental Physiology* 75 (4):587-595
- 14 Bohnert D y Merrill M (2007). Using Mycosorb® to address physiologic changes induced by endophyte-infected tall fescue. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries Proceedings of Alltech's Twenty Third Annual Symposium Edited by TP Lyons, KA Nottingham University Press United Kingdom Nottingham. Primera Edición.

- 15 Bruneton Jean (2001). Plantas toxicas vegetales peligrosos para el hombre y animales 1° Edicion. Editorial: ACRIBIA.
- 16 Cardozo P, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82:3230-3236.
- 17 Carrillo Leonor (2003). Microbiología Agrícola. 1° Edicion. Salta: UNSA, Vol 1:60.
- 18 Carlson J, Dickinson E, Yokoyama M, Bradley B (1975). Pulmonary Edema and Emphysema in Cattle After Intraruminal and Intravenous Administration of 3-Methylindole. *Am J Vet Res* 36 (9):341-1347.
- 19 Carlson J y Breeze R (1984). Ruminal metabolism of plant toxins with emphasis on indolic compounds. *Journal of Animal Science* 58 (4):1040-1048.
- 20 Cavallito C y Bailey J (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. Am. Chem. Soc.* 66:1950-1951.
- 21 Crevar M, Ivkovic B, Vladimirov S, Kuntica V, Vujic Z (2008). Statistical Optimization of Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography for the Analysis of Caffeine Paracetamol and its Degradation Product p-aminophenol. *Acta Chim. Slov* 55:665-670.
- 22 Culvenor C C (1973). Alkaloids. In: G.W. Butler and R.W. Bailey (Ed.) *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Academic Press London. 1:375-446.
- 23 Chansiripornchai P y Fink-Gremmels J (2004). Evaluation of the Aflatoxin B1 Adsorption capacity of Bentonite using an *In Vitro* Method mimicking Monogastric Gastro-Intestinal Tract conditions. *Thai J. Vet. Med.* 34 (1) 31
- 24 Cheeke P (1988). Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. *J Anim Sci.* 66(9):2343-2350.
- 25 Chestnut A, Anderson P, Cochran M, Fribourg H, Gwinn K (1992). Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on fescue toxicosis and mineral absorption. *J. Anim. Sci.* 70:2838-2846.
- 26 Chiarini F, Barboza G, Marticorena A (2007). Novelty in solanum and Salpichroa (solanaceae) from southern south america *Gayana Bot.* 64(1):46-59
- 27 Church D y Pond W (1992). Fundamentos de Nutrición y Alimentación de animales. 1° Edicion. Editorial Limusa SA.
Church pagina 22
- 28 Cooper M y Johnson A (1984). Poisonous Plants in Britain and other effects on Animals and Man. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Ref. Book N° 161: 219-220. London.
- 29 Cordell Geoffrey (2009). *The Alkaloids: Chemistry and Biology* Vol 67. Academic Press Inc.
- 30 de Aragão N, Veloso M, Bispo M, Ferreira S, de Andrade J (2005). Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Talanta* 67(5):1007-1013.
- 31 de Barros S, Riet-Correa F, Andujar M, de Barros C, Mendez M, Schild A (1987). Solanum fastigiatum var. fastigiatum and Solanum sp. poisoning in cattle: ultrastructural changes in the cerebellum. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 7(1):1-5.
- 32 De Lorme M, Lodge-Ivey L, Craig A (2007). Physiological and digestive effects of fed to lambs-infected tall fescue *Neotyphodium coenophialum*. *J. Anim Sci* 85:1199-1206

- 33 De Vries J, Johnson K, Heroff J (2006). HPLC Determination of Caffeine and Theobromine Content of Various Natural and Red Dutched Cocoas. *Journal of Food Science* 46 (6):1968-1969.
- 34 Deferme S, Annaert P, Augustijns P (2000). Biotechnology: Pharmaceutical Aspects. Drug Absorption studies. In situ. In vitro and In silico models. Edicion Carsten-Edrhardt- Springer's AAPS Press.
- 35 Dupont M, Múzquiz M, Estrella I, Fenwick G, Price K (1994). Relationship between the Sensory Properties of Lupin Seed with Alkaloid and Tannin Content. *J. Sci. Food Agric.* 65: 95-100.
- 36 Emi Y, Tsunashima D, Ogawara K, Higaki K, Kimura T (1998). Role of P-Glycoprotein as a Secretory Mechanism in Quinidine absorption from rat small intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87 (3):295-299.
- 37 Fay L, Dinh S, Michael H (1993). A Comparison of Spectroscopic Full-Spectrum Quantitation (FSQ) and High Performance Liquid Chromatography Methods for Multicomponent Pharmaceutical Analysis SimonianBeckman Instruments, Inc. Technical Information Bulletin, A-1738 12, Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA.
- 38 Field M, Fromm D, McColl I (1971). Ion transport in rabbit ileal mucosa. I. Na and Cl fluxes and short-circuit current. *Am J Physiol* 220 (5):1388-1396.
- 39 Fordtran J, Scroggie W, Polter D (1964). Colonic Absorption Of Tryptophan Metabolites In Man. *J Lab Clin Med* 64:125-32.
- 40 Freeland W y Janzen D (1974). Strategies in herbivory by mammals: the role of plant secondary compounds. *AM Nat* 108:269-289
- 41 Friedman M, Rayburn J, Bantle J(1991). Developmental toxicology of potato alkaloids in the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus (FETAX). *Food Chem Toxicol* 29(8):537-547.
- 42 Friedman M y Levin C (1998). Dehydrotomatine content in tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4571-4576.
- 43 Friedman Mendel (2004). Analysis of biologically active compounds in potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*Lycopersicon esculentum*), and jimson weed (*Datura stramonium*) seeds. *Journal of Chromatography A* 1054: 143-155
- 44 Gäbel G y Aschenbach J (2002). Influence of food deprivation on the transport of 3-O-methyl- α -D-glucose across the isolated ruminal epithelium of sheep. *J Anim Sci* 80:2740-2746.
- 45 Galindo W, Rosales M, Murgueitio M, Larrahondo J (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros. *Livestock Res. Rural Develop.* 1(1):36.
- 46 García Sacristán (1995). Fisiología Veterinaria.1^o Edicion. Editorial Interamericana/McGraw-Hill. Madrid.
- 47 Gee J, Dupont S, Day A, Plumb G, Williamson G, Johnxon I (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with hexose transport pathway. *J Nutrition* 130:2765-2771.
- 48 Graham C y Simmons N (2005). Functional organization of the bovine rumen epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: 173-181.
- 49 Gray V y Dressman J (1996). Change of pH requirements for simulated intestinal fluid TS. *Pharmacop Forum* 22:1943-1945.
- 50 Gunter S, Beck P, Kreider D, Gregorini K, Stewart C (2009). The Effects of a Modified Glucomannan on the Performance of Stocker Cattle Grazing Endophyte-Infected Tall Fescue. *Prof Animal Scientist* 25 (3):300-306.

- 51 Harborne J B (1993). Introduction to the ecological Biochemistry. 4ta Edicion. Academic Press an *Elsevier Science Imprint*, San Diego. CA.
- 52 Harvey M, Morris B, McMillan M, Marks V (1985). Measurement of potato steroidal alkaloids in human serum and saliva by radioimmunoassay. *Hum. Toxicol* 4:503-512.
- 53 Higa K, Lopes L, Schild M, Ana L, Haraguchi M. (2007). Flavonóides glicosídicos nas folhas de *Solanum fastigiatum*. *Jornal Brasileira de Fitomedicina* 5, 174.
- 54 Hill N, Thompson F, Stuedemann J, Rottinghaus G, Ju H, Dawe D, Hiatt E (2001). Ergot alkaloid transport across ruminant gastric tissues. *J Anim Sci* 79:542-549.
- 55 Hiroyuki T, Waraporn P, Chiyumi T, Yukihiro S (1997). A simple determination of steroidal alkaloid glycosides by thin-layer chromatography immunostaining using monoclonal antibody against solamargine. *FEBS letters* 404:279-282.
- 56 Hukkanen J, Jacob III P, Benowitz N (2005). Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol Rev* 57:79-115.
- 57 Hutchinson T (1977). Onions as a cause of Heinz body anemia and death in cattle. *Can. Vet. J.* 18:358-360.
- 58 Huwig A, Freimund S, Kappeli O, Dutler H (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. *Toxicol. Lett.* 122:179-188.
- 59 Hyun Kim D, Hoon Yoon B, Kim Y, Lee S, Shin Y, Jung J, Kim H, Lee Y, Choi J, Kim S, Lee K, Ryu J (2007). The Seed Extract of Cassia obtusifolia Ameliorates Learning and Memory Impairments Induced by Scopolamine or Transient Cerebral Hypoperfusion in Mice. *J Pharmacol Sci* 105:82-93.
- 60 Iwashita M, Saito M, Yamaguchi Y, Takagaki R, Nakahata N(2007). Inhibitory Effect of Ethanol Extract of Piper longum L. on Rabbit Platelet Aggregation through Antagonizing Thromboxane A2 Receptor. *Biol. Pharm. Bull.* 30(7):1221-1225.
- 61 Jagerdeo E, Passeti E, Dugar S (2000). Liquid Chromatographic Determination of Vanillin and Related Aromatic Compounds. *Journal of AOAC International.* 83 (1)20:237
- 62 Jenkins W, Davis L, Boulos B. (1975) Transfer of drugs across the ruminal wall in goats. *Am J vet Res* 36(12):1771-1776.
- 63 Jolly R. (1993). Lysosomal storage diseases in livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 9 (1):41-53.
- 64 Kai M, Hayashi K, Kaida I, Aki H, Yamamoto M (2002). Permeation-Enhancing Effect of Aloe-emodin Anthrone on Water-Soluble and Poorly Permeable Compounds in Rat Colonic Mucosa *Biol. Pharm. Bull.* 25 (12): 1608-1613.
- 65 Keeler R y Tu A (1991). En: Handbook of natural toxins. Vol 6. Toxicology of Plant and fungal compound. Marcel Dekker Inc. New York, NY.
- 66 Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner D (2004). Solanaceae-a model for linking genomics with biodiversity *Comp Funct Genom* 5:285-291.
- 67 Knight A, Lassen D, McBride T, Marsh D, Kimberling C, Delgado M, Gould D (2000). Adaption of pregnant ewes to an exclusive onion diet. *Vet. Hum. Toxicol.* 42:1-4.
- 68 Kozakai T, Katoh K, Obara Y (2004). Magnesium increases calcium absorption mediated by transcellular transport in small intestine of goats and rats. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13(1):277-280.

- 69 Kozukue N, Kozukue E, Mizuno S (1987). Glycoalkaloids in potato plants and tubers. *HortScience* 22:294-296.
- 70 Lang I y Martens H (1999). Na transport in sheep rumen is modulated by voltage-dependent cation conductance in apical membrane. *American Journal Physiology Gastrointestinal* 277:609-618.
- 71 Lennernas H, Nylander S, Ungell A (1997). Jejunal Pemeability: A comparison between the ussing chambers technique and the single-pass perfusion in humans. *Pharmaceutical Research* 14 (5):667-671.
- 72 Leonhard-Marek S, Stumpff F, Brinkmann I, Breves G, Martens H (2005). Basolateral Mg²⁺/Na⁺ exchange regulates apical nonselective cation channelin sheep rumen epithelium via cytosolic Mg²⁺. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:630-645.
- 73 Leonhard-Marek S, Breves G, Busche R (2006). Effect of chloride on pH microclimate and electrogenic Na⁺ absorption across the rumen epithelium of goat and sheep S. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 29:246-252.
- 74 Li H, Sheppard D, Hug M (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *Journal of Cystic Fibrosis* 3:123-126.
- 75 Li Y, Yang S, Li H, Xu L (2008). Two New Alkaloids from Capparis himalayensis. *Chem. Pharm. Bull.* 56 (2):189-191.
- 76 Lincoln S, Howell M, Combs J, Hinman D (1992). Hematologic effects and feeding performance in cattle fed cull domestic onions (*Allium cepa*). *J. Am. Vet. Med. Assoc* 200:1090-1094.
- 77 Lomax A, O'Hara J, Hyland N, Mawe G, Sharkey K (2007). Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:482-491.
- 78 Mardonesa P, Andrinoloa D, Csendesb A, Lagos N (2004). Permeability of human jejunal segments to gonyautoxins measured by the Ussing chamber technique. *Toxicon* 44:521-528.
- 79 Matthews J y Webb K (1995). Absorption of L-Varnosine, L-Methionine, and L-Methionylglycine by Isolated Sheep Ruminal and Omasal Epithelial Tissue. *J. Anim. Sci.* 73:3464-3475.
- 80 Matuschek M, Hendriks W, McGhie T, Reynolds G (2005). The jejunum is the main site of absorption for the anthocyanins in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17(1):31-36.
- 81 Maznah Ismail (1989). The use Caco-2 Cell as an in vitro method to study bioavailbility of iron. *Mal J Nutr* 5:31-35.
- 82 McCalley D (1983). Analysis of the Cinchona Alkaloids by Liquid Chromatography Reversed-Phase Chromatography on Octadecylsilyl Columns. *Chromatographia* 17 (5):264-266.
- 83 McCollum J y Webb E (1998). Glycyl-L-Sarcosine Absorption Across Ovine Omasal Epithelium Durin Coincubation with Other Peptide Substrates and Volatile Fatty Acids. *J. Anim. Sci.* 76:2706-2711.
- 84 Medeiros R, Guilherme R, Riet-Correa F, Barboza R, Lima F. (2004) Experimental poisoning by *Solanum paniculatum* (jurubeba) in cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 24(41).
- 85 Mentz L y Schenkel E (1989). Plantas medicinais: A coerência e a Confiabilidade das indicações Terapêuticas. *Caderno de Farmácia* 5(1/2):93-119.

- 86 Merrill M, Bohnert D, Harmon D, Craig A, Schrick F (2007). The ability of a yeast-derived cell wall preparation to minimize the toxic effects of high-ergot alkaloid tall fescue straw in beef cattle. *J. Anim Sci* 85:2596-2605.
- 87 Mesia-Vela S, Santos M, Souccar C, Lima-Landman T, Lapa J (2002) *Solanum paniculatum* L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice. *Phytomedicine* 9 (6):508-514.
- 88 Miller M, Macnaughton W, Zhang X, Thompson J, Charbonnet R, Bobrowski P, Lao J, Trentacosti A, Sandoval M (2000). Treatment of gastric ulcers and diarrhea with the Amazonian herbal medicine sangre de grado. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:192-200.
- 89 Mineo H, Hara H, Kikuchi H, Sakurai H, Tomita F (2001). Various Indigestible Saccharides Enhance Net Calcium Transport from the Epithelium of the Small and Large Intestine of Rats In Vitro. *Journal of Nutrition* 131:3246-3246.
- 90 Molyneux R y Ralphs M (1992). Plant toxins and palatability to herbivores. *J. Range Manage* 45:13-18.
- 91 Mosquera O, Niño J, Correa Y, Hernández M (2004). Detección in-vitro de inhibidores de la acetilcolinesterasa en extractos de cuarenta plantas de la flora colombiana mediante el Método cromatográfico de Ellman. *Scientia et Technica* 10 (26).
- 92 Mossberg M y Ross G (1967). Ammonia movement in the small intestine: preferential transport by the ileum. *J Clin Invest* 46 (4):490-498.
- 93 Neiva M, Da Mota D, Batista V, Sousa-Rodrigues C (2006). Mucous membrane of the rumen of ovines, fed with spineless, forrage cactus or palm (Barbary fig) (*Opuntia ficus indica* Mil): Histochemical study by means of light microscopy. *Int. J. Morphol.* 24 (4):723-728.
- 94 Pascual-Villalobos M & Robledo A (1999). Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. *Biochem. Syst. Ecol* (27):1-10.
- 95 Pérez-Amador M, Muñoz V, García J, González A (2007). Alkaloids in *Solanum torvum* Sw (Solanaceae). *Phyton* 76:39-45
- 96 Pianzola M, Zarantonella L, Gonzalez G, Franco Fraguas L, Vazquez A (2005). Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild accessions of *Solanum commersonii*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33:67-78.
- 97 Pineda D, Vitoriano V, Dislich C, Varella D, Leite R, Higashi T, de Moraes S (2007). Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH-reduction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 43 (2).
- 98 Qiu Liu Z, Hong Jiang Z, Liu L, Hu Ming (2006) Mechanisms Responsible for Poor Oral Bioavailability of Paeoniflorin: Role of Intestinal Disposition and Interactions with Sinomenine. *Pharmaceutical Research* 23(12):2768-2780
- 99 Ramos G, Frutos P, Giráldez F, Mantecón R (1998). Los Compuestos Secundarios de las plantas en la nutrición de los Herbívoros. *Arch. Zootec.* 47: 597-620.
- 100 Ralph M, Olsen D, Pfister A, Manners D (1988). Plant-Animal interactions in Larkspur poisoning in cattle. *J Anim Sci.* 66:2334-2342.

- 101 Reynolds C, Durst B, Lupoli B, Humphries D, Beever D (2004). Visceral Tissues mass in transition dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *Journal Dairy Science* 87:961-971.
- 102 Riet-Correa F, Méndez MC, Schild A, Summers B, Oliveira J (1983). Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. *Cornell Vet* 73:240-256.
- 103 Riet-Correa F, Schild A, Lemos R, Borges R (2007). Doenças de Ruminantes e equídeos. 3era Edición. UFMS- Equale Press. 2:182-184.
- 104 Rose R y Schultz S (1971). Studies on the Electrical Potential Profile across Rabbit Ileum Effects of sugars and amino acids on transmural and transmucosal electrical potential difference. *Journal of General Physiology* 57
- 105 Rubas W y Cromwell M (1997). The effect of chemical modifications on octanol/water partition (log D) and permeabilities across Caco-2 monolayers. *Advanced Drug Delivery Reviews* (23):157-162.
- 106 Ruiz-Díaz A, Verdes J, Moraña A, Gutiérrez F, Battes D, Vázquez A (2004). Characterization and biological activity of *Solanum bonariense* L. hydroalcoholic fraction in mice. *Pesq Vet Bras* 24:57-58.
- 107 Ruckebusch Y y Thivend P (1980). Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Wesport, Cl. AVI Publishing. 587.
- 108 Saurin W, Hfnung M, Dassa E (1999). Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *J Mol Evol* 48:22-41.
- 109 Scheffer G, Kool M, Heijn M, de Haas M, Pijnenborg A, Wijnholds J, van Helvoort A, de Jong M, Hooijberg J, Mol C, van der Linden M, de Vree J, van der Valk P, Oude Elferink J, Borst P, Scheper R (2000). Specific Detection of Multidrug Resistance Proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-Glycoprotein with a Panel of Monoclonal Antibodies1. *Cancer Research* 60:5269-5277.
- 110 Schelee D (1991). Ecologic significance of secondary natural products. *Pharmazie* 46:19-23.
- 111 Schested J, Diernaes L, Moller D, Skadhauge E (1999). Ruminal transport and metabolism of short Chain fatty acids (SCFA) in Vitro: effect of SCFA Chain length and pH. *Comparative Biochemistry and physiology Part A* 123:359-368
- 112 Shappell N y Smith D (2005). Ergovaline movement across Caco-2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 41:245-251.
- 113 Sharma R, Taylor M, Bourcier D (1983). Subcellular distribution of alpha-chaconine in mouse hepatocytes. *Drug Chem. Toxicol.* 6:219-234.
- 114 Siri M, Villanueva P, Pianzola M, Franco Fraguas L, Galvan G, Acosta M, Ferreira F (2004). In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. from Uruguay. *Potato Research* 47:127-138.
- 115 Smith G (1992). Toxicification and detoxification of plant compounds by ruminants: an overview. *J. Range Manage* 45:25-30.
- 116 Steven D y Marshall A (1970). Organization of the rumen epithelium. In *Physiology of Digestion and Metabolism in the ruminant* (edited by A.T Phillipson). Newcastle-upon-tyne: Oriel Press: 80-100.
- 117 Suzuki H, Yanaka A, Muto H (2000). Luminal ammonia retards restitution of guinea pig injured gastric mucosa in vitro *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:107-117.
- 118 Tisserand R y Balacs T (1995): *Essential oil safety*. 1ª Edición. London, Churchill Livingstone.

- 119 Torsell K (1983). Natural product chemistry EDITORIAL: Chichester John Wiley.
- 120 Trivedi P, Pundarikakshudu K (2007). Novel TLC Densitometric Method for Quantification Of Solasodine in Various Solanum Species, Market Samples and Formulations. *Chromatographia* 65(3/4)
- 121 Tsai J, Tsai S, Chang W (2004). Effect of Ethanol Extracts of Three Chinese Medicinal Plants With Anti-diarrheal Properties on Ion Transport of the Rat Intestinal Epithelia. *J Pharmacol Sci* 94:60-66.
- 122 Valkonen J, Keskitalo M, Vasara T, Pietila L (1996). Potato glycoalkaloids: a burden or a blessing? *Critical reviews in plant sciences* 15(1):1-20.
- 123 Van Soest Peter (1994). Nutritional Ecology of the ruminant. 2° Edicion. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- 124 Vandamme Th y Ellis K (2004). Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews* 56:14-15.
- 125 Vázquez, A (1997). “Química y biología de las Solanáceas”, Tesis de Doctorado en Química, PEDECIBA Facultad de Química, Univ. de la República, Montevideo, Uruguay.
- 126 Verdes J, Moraña A, Gutiérrez F (2000). Toxicity of fractions obtained from Solanum bonariensis. En: XXI World Buiatrics Congress, Punta del Este, Uruguay. pp. 10381-10384
- 127 Verdes J, Moraña A, Gutiérrez F, Battes D, Fidalgo L, Guerrero F (2006). Cerebellar degeneration in cattle grazing Solanum bonariense (“naranjillo”) in western Uruguay. *J Vet Diagn Invest* 18:299-303.
- 128 Verdes J, Moraña A, Gutiérrez F, Guerrero F, Goicoa A, Fidalgo L and Riet-Correa F (2007). Chapter 35: Comparative study of bovine cerebellar cortical degenerations caused by different South American *Solanum* spp. In: Poisonous Plants: Global Research and Solutions. Panter KE, Wierenga TL, and Pfister JA eds. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK. pp. 244-249
- 129 Verhoeff J, Hajer R, Ingh V (1985). Onion poisoning of young cattle. *Vet. Rec.* 9:497-498.
- 130 Wei Yang X, Teng J, Wang J, Xu W (2009). The Permeability and the Efflux of Alkaloids of the Evodiae Fructus in the Caco-2 Model. *Phytother. Res.* 23:56-60.
- 131 Westendorf M, Mitchell G, Tucker Jr, Tucker J (1992). Influence of rumen fermentation on response to endophyte-infected tall fescue seed measured by a rat bioassay. *Drug Chem. Toxicol.* 15:351-364.
- 132 Wink M (2003). Toxicology. By Wink Editor. Elsevier Science Ltda:134-142
- 133 Xia Li H, Yu Ding M, Lv K, Yuan Yu J (2001). Determination Of The Active Ingredients In Chuanxiong By Hplc, Hplc-Ms, And Ei-Ms *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 24(13):2017-2031.
- 134 Zambrano M, Riet-Correa F, Schild A, Mendez M (1985). Intoxicacion por Solanum fastigiatum var. fastigiatum: evolucao e reversibilidade das lesoes em bovinos, e susceptibilidade de ovinos, coelhos, cobaios e ratos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 5(4):133-141.
- 135 Zuñiga J, Tur Mari J, Milocco S, Piñeiro R (2001). Ciencia y Tecnologia em proteccion y experimentacion animal. Mc Graw-Hill Interamericana.
- 136 Zuo Y, Chen H, Deng Y (2002). Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with Potodiode array detector. *Talanta* 57:307-316.

11. GLOSARIO

Alelopáticos: Algunas plantas liberan componentes químicos capaces de interferir en el desenvolvimiento de las especies vecinas. La alelopatía consiste en el efecto causado por una planta sobre otra a través de compuestos químicos liberados al medio. Estos efectos tanto pueden ser beneficiosos como perjudiciales.

Fenología: Es el estudio las manifestaciones periódicas o estacionales de las plantas (floración, aparición de frutos y su maduración, caída de hojas y las variables meteorológicas que afectan a las mismas).

Xenobióticos: deriva del griego "xeno" ("extraño") y "bio" ("vida"). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente debido a que son compuestos sintetizados por el hombre en el laboratorio. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años.

12. ANEXOS

Anexo N°I. Composición química e ingredientes del alimento balanceado de rata.

Composición Química		Porcentaje	Elementos que integran el alimento
Proteína al éter -	Minimo	23%	Arroz y /o Sorgo y/o Maíz y/o Cebada y/o Trigo, afrechillo de Arroz y/o Trigo/ Harina de Carne y Huesos y/o Soya y/o Sangre y/o Girasol y/o Pescado, Grasa adicionada, Sal, Melaza, Núcleo Vitamínico Mineral: 1 (grs/kg de mix) Vitamina A1.4 MIL, Vitamina D3 0,20 ; Vitamina E (10.0); Vitamina B1 (0,80) Vitamina B2 (1,0) ; Vitamina B6 (1,2) ; Vitamina B12 (0.004) ; Vitamina B5 (5,0) biotina (0,02) ; Vitamina B 3 (4,0) ; Acido fólico (0,20) ; Colina (50,0) Fé (16,0); Zn (10,0) Mn (10,0) ; Cu (1,0) I (0,10) Co (0,14) ; Sn (0,04) ; Mg (100,0) ;Ca (147,8)
Humedad	Máximo	6%	
Fibra	Máximo	12-13%	
Fibra	Mínimo	4%	
Minerales Totales	Máximo	10%	
NaCl	Máximo	0,7%	
Calcio	Máximo	2,5%	
Calcio	Mínimo	1%	
Fósforo	Máximo	1,2%	
Fósforo	Mínimo	0,8%	
Insoluble al HCl	Máximo	2%	
D.O.N	Máximo	2ppm	

Anexo II. Composición química e ingredientes del alimento balanceado de los bovinos en base fresca.

Composición Química		Porcentaje	Elementos que integran el alimento	
Proteína al éter -	Minimo	18%	Vitamina A	7.200 UI
Humedad	Máximo	13,5%	Vitamina D3	1.800 UI
Fibra	Máximo	9%	Vitamina E	22,5 mg
Minerales Totales	Máximo	10%	Manganeso	33 mg
NaCl	Máximo	0.6%	Yodo	1,2 mg
Calcio	Máximo	2.0%	Hierro	5,1 mg
Calcio	Mínimo	0.7%	Cobre	20,4 mg
Fósforo	Máximo	1.2%	Zinc	90 mg
Fósforo	Mínimo	0.4%	Selenio	0,6 mg
Insoluble al HCl	Máximo	2%	Magnesio	0,45 mg
D.O.N	Máximo	5ppm	Azufre	0,36 mg
Claviceps Purp	Máximo	0,03%	Cobalto	0,39 mg
			NDT	89%

Anexo III. Composición de las soluciones Buffer utilizadas en los experimentos in Vitro.

Composición del Ringer Krebs	Rata (KRPr)	Bovinos (KRPb)
NaCl	125	110
KCl	4	4.7
CaCl2	1.25	2.56
MgCl2	-	1.1
NaH2PO4	-	1.8
Na2HPO4	-	0.8
NaHCO3	-	33.3
Glucosa	10	13.9
TRIS	30	-
<i>Cantidad</i>	<i>Mmol/l</i>	<i>Mmol/l</i>