

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SAPONINAS DE LA CORTEZA DE *Inga marginata* Willd

Jairo Calle Álvarez*, Roberto Pinzón Serrano, Luis Fernando Ospina
y Luis Alfonso Avellaneda Torres

* Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. AA14490.
E. Mail: ropinzon@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

La corteza de *Inga marginata* Willd. contiene saponinas, taninos, fitosteroles y triterpenoides. Por cromatografía de capa delgada (CCD) se encontraron 5 saponinas. Con el extracto etanólico y las saponinas crudas se realizaron ensayos para determinar su actividad antibacteriana y antifúngica, farmacológica con ratas Wistar y ratones OF-1, e icotóxica sobre el pez Guppy *Poecilia reticulata* Peters. Las saponinas de la corteza poseen actividad depresora sobre el SNC en ratas y ratones. La actividad contra bacterias es baja, mientras que contra hongos es manifiesta. Las saponinas inhiben el crecimiento de tumores en los discos de zanahoria en un 99 %. Son tóxicas para el pez Guppy (*Poecilia reticulata*), CL_{50} a 96 h: 5,5 mg/L.

Palabras Clave: *Inga marginata* - Saponinas

SUMMARY

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SAPONINS FROM THE BARK OF *Inga marginata* Willd

The bark of *Inga marginata* Willd. contains saponins, tannins, phytosterols and triterpens. Thin layer chromatography showed 5 saponins. Antibacterial and antifungal activities as well as the icototoxic activity on Guppy *Poecilia reticulata* Peters and pharmacological activities on Wistar rats and OF-1 mice were determined.

The results showed depressive activity on CNS, a low antibacterial activity but good antifungal activity. The toxicity on Guppy fishes expressed as LC_{50} is 5.5 mg/L. The saponins showed inhibition of tumor growth on carrot dishes by 99%.

Key Words: *Inga marginata* - Saponins

Recibido para evaluación: 24 de octubre de 1997

Aprobado para publicación 18 de noviembre de 1997

INTRODUCCIÓN

En ensayos preliminares con los extractos de las hojas y de la corteza se pudo determinar una actividad citotóxica en fibroblastos de pulmón de Hamster chino (1). En general las ingas (guamos) tienen uso en medicina tradicional; las hojas y la corteza se emplean en decocciones como astringentes, las raíces para el tratamiento de la disenteria y diarreas crónicas, el fruto en las irritaciones de la mucosa intestinal y contra la hidropesía (2, 3, 4). *Inga marginata* Willd se conoce en Colombia con el nombre de guamo negro o guamo churimo y su fruto es comestible y muy apetecido debido a su sabor dulce (2). Su principal uso es como sombrero en cafetales y cacaotales. No se encontraron estudios fitoquímicos o farmacológicos de esta especie.

PARTE EXPERIMENTAL

Material

La corteza se recolectó en la zona de Puente la Balsa, Municipio de Cáqueza, Cundinamarca, en Noviembre de 1995. Un ejemplar reposa en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número 388697 clasificado por el botánico C. Barbosa como *Inga marginata* Willd.

Preparación del material vegetal

La corteza se secó en horno de aire circulante (40-50 °C.), se molió y se tamizó. Se realizó la marcha fitoquímica descrita por A. Sanabria (5).

La corteza molida, 2600 g, se desengrasó con éter de petróleo, posteriormente se percoló con etanol del 96 %, el extracto se concentró al vacío y se pesó. Se disolvió en etanol y se agregó agua fría, con lo cual precipitan la mayor parte de los taninos, se filtró y el filtrado se extrajo por partición con isobutanol obteniéndose después de retirar el solvente, las saponinas crudas.

Para determinar el número de saponinas presentes en los extractos de la corteza, se empleó cromatografía

en capa delgada con gel de sílice, como fase móvil mezcla de CHCl_3 -MeOH- H_2O (30 : 15 : 3) y como reveladores vainillina-ácido ortofosfórico y una solución de gelatina sangre, la cual se coloca sobre la placa cromatográfica y donde existan saponinas, aparecen manchas blancas producto de la hemólisis (6). Los azúcares presentes en las saponinas se determinaron haciendo hidrólisis en medio ácido (7). La determinación de las sapogeninas se realizó por cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice (CCD), usando como fase móvil cloroformo-acetona (4 : 1), revelando con vainillina - ácido ortofosfórico. Los azúcares obtenidos de la hidrólisis se cromatografiaron sobre gel de sílice, comparándolos con patrones, usando como fase móvil dos sistemas: S_1 , CHCl_3 -MeOH- H_2O (30:20:4) y S_2 AcOEt -IsoBuOH- H_2O (40:25:8), revelando con α -naftol en medio ácido. Se determinó el índice de espuma (8, 9) y el índice de hemólisis (9, 10).

Pruebas biológicas

El ensayo de actividad antimicrobiana, antibacteriana y antifúngica, se realizó mediante la metodología descrita en el Manual de Técnicas del CYTED (11). El ensayo de tumorigénesis en discos de zanahoria por la técnica descrita por Galsky (12).

El test hipocrático se realizó siguiendo el esquema descrito en el Manual de Técnicas del CYTED (11) y para el test de Irwin se siguió la metodología descrita por el mismo (13).

Para el ensayo de ictiotoxicidad se siguieron las técnicas descritas por Fontorelli (14) y por Sinha (15). En éstas se recomienda que los peces deben provenir de captura en su medio natural, los peces fueron obtenidos en el Corregimiento de La Capilla, Municipio de Zipacón, clasificados por el biólogo Mauricio Camargo como *Poecilia reticulata* Peters.

Se utilizó agua del acueducto en un acuario de 90 litros, se dejó en reposo durante dos días y seguidamente se colocaron los peces. El tiempo esperado para realizar el ensayo inicial fue de 7 días considerándose apropiado para observar un acondicionamiento normal de los peces para el ensayo. Estos se alimentaron con Tetramin®, la cantidad para peces juveniles adultos está entre 5 y 7 % de alimento diario respecto del peso corporal, con un día de ayuno por semana.

Ensayo preliminar: Se ensayaron el extracto etanólico total y las saponinas crudas en concentraciones de

1, 10 y 100 mg/L, disolviendo el primero en etanol y las segundas en agua.

En 8 recipientes transparentes con capacidad de un litro, se agregó agua como se mencionó anteriormente para el acuario, dos recipientes se llenaron completamente con un litro y los 6 restantes con 995 ml, se utilizaron dos blancos, uno con 5 ml de etanol y el otro con 5 ml de agua. Se agregaron 10 peces por recipiente cuya longitud estaba entre 1-2 cm; las soluciones con el extracto etanólico total y las saponinas fueron vertidas y a partir de este momento se dió comienzo a la prueba por un tiempo de 96 horas, durante el cual se realizaron observaciones diarias del comportamiento de los peces.

Ensayo definitivo: Se procedió de la manera anterior, las concentraciones elegidas incluyeron preferentemente a la menor concentración que en el ensayo preliminar produjo una mortalidad del 100 % y a la mayor que no produjo mortalidad para ambos extractos. Los ensayos se realizaron por triplicado en un tiempo de 96 horas. Se utilizó la metodología para un test estático, donde no existe renovación de las soluciones test a lo largo del ensayo, es decir no hay renovación de los extractos o el agua y los parámetros a medir por parte de esta se pueden registrar tanto al comienzo como al final del ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la corteza de *Inga marginata* Willd se encontraron saponinas, taninos, fitosteroles y triterpenoides. El rendimiento del extracto etanólico fue de 317 g (12 %) y de saponinas crudas 14 g (0,5%).

Se encontró que existen 5 saponinas con valores de R_f entre 0,18 y 0,49. Las sapogeninas obtenidas mediante la hidrólisis ácida fueron 5 y sus valores de R_f están entre 0,08 y 0,76. Por comparación con los patrones puede inferirse que existen cuatro azúcares y que uno de ellos posiblemente es glucosa.

El índice de hemólisis se realizó con la decocción de la corteza en una concentración de 0.08 %, las saponinas crudas en una concentración de 0.0008 % y una saponina patrón (según Farmacopea Helvética V) en una concentración de 0.0001 %; se tomó la dilución de menor concentración que presentó hemólisis total; para la decocción de la corteza se obtuvo en los tubos 5-6 y sus concentraciones equivalen al 0,024 % y 0,026 %, de este modo se efectuó un promedio entre las dos mediciones y se determinó el índice de hemólisis para la decocción el cual fue 4.167, para las saponinas crudas 357.142 y para el patrón de saponina 3.333.333.

El extracto etanólico no mostró actividad contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*. Las saponinas crudas presentaron muy baja actividad contra *S. aureus* y *S. gallinarum*.

El extracto etanólico mostró zonas de reducción de la población a 300 mg/ml contra los hongos *Mucor sp*, *Pithium debaryanum* y la levadura *Candida albicans*. Contra *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum dianthi* no presentaron actividad. Se observaron halos de inhibición de menor diámetro que los del patrón de anfotericina B. Las saponinas crudas a 300 mg/ml presentaron zonas de inhibición entre 14 y 15 mm de diámetro frente a *C. albicans*, *Mucor sp*. y *P. debaryanum* y fueron inactivas contra *A. niger* y *F. oxysporum dianthi*. El patrón de Anfotericina B a 10 mcg/ml produjo zonas de inhibición de 14 mm frente a *C. albicans*, de 11 mm frente a *Mucor sp*. y de 10 mm frente a *A. niger*; a 1.064 mcg/ml inhibió a *P. debaryanum* 10 mm y a *F. oxysporum dianthi* 18 mm de diámetro.

Tanto el extracto etanólico como las saponinas crudas mostraron muy buena actividad en el ensayo de tumorigénesis inhibiendo el primero un 96 % y las segundas un 99 % la aparición de tumores en los discos de zanahoria.

Los ensayos de ictiotoxicidad con el pez "Guppy" *Poecilia reticulata* Peters dieron concentraciones letales 50 a 96 horas de 6,8 mg/L para el extracto etanólico y 5,5 mg/L para las saponinas crudas. La concentración letal 50 se calculó mediante regresión lineal y en los casos en que se presentaron muertes en el ensayo de control, el porcentaje de mortalidad se corrigió utilizando la corrección de Abbott.

En el test hipocrático se utilizó el extracto etanólico por vía oral en una dosis de 500 mg/Kg, observándose marcada depresión, piloerección, disnea y disminución de la actividad motora. El test de Irwin se realizó con las saponinas crudas en dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg, se utilizó la vía intraperitoneal. Se observó depresión, temores, fasciculaciones, piloerección, lacrimación leve y muerte antes de 24 horas para la dosis de 200 mg/Kg y muerte antes de 48 horas para las demás dosis ensayadas. La necropsia mostró manchas blanquecinas en los riñones y coágulos sanguíneos dentro de los intestinos, los demás órganos mostraron coloración normal; se determinó que la dosis que causa la muerte a ratones está entre 25 y 50mg/Kg.

Agradecimientos

Al proyecto "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región", al CYTED, a la OEA y la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo económico.

BIBLIOGRAFÍA

1. A. López, J. Calle, R. Pinzon, A. Marín y A. Monge. *Phytoterapy Research*, **10**, 431 (1996).
2. H. Garcia Barriga, "Flora Medicinal de Colombia", 1a ed., Imprenta Nacional, Bogotá, Colombia, 1974, tomo 1, p. 418.
3. D. De Lucca. "Flora Medicinal Boliviana", 1a ed, Los Amigos del Libro, La Paz, Bolivia, 1992, p. 203.
4. C. Romero. "Frutos Silvestres de Colombia", 2a ed., editorial ABC, Bogotá, Colombia, 1991, p. 293.
5. A. Sanabria. "Análisis Fitoquímico Preliminar, Metodología y su Aplicación en la Evaluación de 40 Plantas de la Familia Compositae", Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá, Colombia, 1983, 113 pp.
6. E. Sthal. "Drug Analysis By Chromatography And Microscopy. A Practical Supplement To Inc. Pharmacopoeias", Ann Arbor Science Publishers, 1973, p. 219.
7. Y. Shafik. "Chemistry of Crude Drugs. Laboratory Manual", Cairo University, 1986.
8. Pharmacopée Francaise IX Ed., 1972, p. 306.
9. E. Calderón. "Guía para el Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica", Universidad Nacional de Colombia, 1963.
10. Farmacopea Helvética, 6a ed, edición en francés, Berna, 1971, p. 187.
11. Manual de Técnicas de Investigación CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Bogotá, Colombia, 1995.
12. G.A. Galsky. *Plant Physiol.*, **65**, 184 (1980).
13. Irwin, S. *Science*, **136**, 123 (1962).
14. Fontorelli C. "Ensayos Toxicológicos con Organismos Acuáticos para la Evaluación de la Contaminación Ambiental. Conferencias Laboratorio de Toxicología", Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Lujan, Argentina, 1992.
15. M. Sinha et al. *Journal Freshwater Biology*, **4** (1), 17 (1992).