

ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR Y LETALIDAD SOBRE *Artemia salina* DE PLANTAS COLOMBIANAS

Antonio Sanabria-Galindo*, Sandra Isabel López* y Roberto Gualdrón*

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.
E.-Mail: asanab@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

Se determinó la letalidad sobre larvas de *A. salina* y se analizó la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, nafto y/o antraquinonas, saponinas, esteroides y/o triterpenoides, lactonas terpénicas, cumarinas y cardiotónicos en 29 especies de Angiospermas. Se discute la relación entre toxicidad sobre *A. salina* y la presencia de dichos metabolitos.

Palabras o Frases Claves: Examen fitoquímico preliminar - *Artemia salina*: letalidad en plantas Constituyentes de plantas.

SUMMARY

PHYTOCHEMICAL SCREENING AND *Artemia salina* LETHALITY OF COLOMBIAN PLANTS

Artemia salina lethality as well as the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, nafto and anthraquinones, saponins, steroids and triterpenoids, terpene lactones, coumarins and cardiotonics were evaluated in 29 species of Angiosperms. Relation between toxicity in *Artemia salina* and the secondary metabolites present in the plants was discussed.

Key Word or Phrases: Phytochemical screening - *Artemia salina*: plants lethality - Plants constituents.

INTRODUCCION

Dentro de las múltiples estrategias que se pueden utilizar para la selección de especies vegetales como fuente de principios bioactivos, el estudio de la letalidad que producen los extractos sobre larvas de *Artemia salina*, ha demostrado ser útil con estos propósitos, especialmente porque se ha encontrado que puede existir una

relación entre esta acción sobre *A. salina* y otras bioactividades como la citotoxicidad (1,2).

Igualmente, los análisis fitoquímicos preliminares, por muchos años también han demostrado ser un método adecuado para poner de manifiesto metabolitos secundarios relacionados con actividades biológicas interesantes.

En el presente estudio se evaluó la letalidad sobre larvas de *A. salina* que produjeron los extractos alcohólicos de 29 especies de plantas superiores y se desarrolló sobre dichas especies un análisis fitoquímico preliminar para establecer la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, nafto y/o antraquinonas, esteroides y/o triterpenoides, lactonas terpénicas, cumarinas y agentes cardioactivos siguiendo la metodología de Sanabria (3). Estos resultados permitieron observar la relación que puede existir entre letalidad sobre *A. salina* y la presencia de estos metabolitos secundarios en las especies estudiadas.

PARTE EXPERIMENTAL

Colección del material vegetal

Todas las especies se colectaron en el departamento de Cundinamarca (Colombia) en regiones cuya altitud oscila entre 600 y 2.500 m.s.n.m. Las especies se seleccionaron teniendo en cuenta usos populares o el hecho de pertenecer a familias de Angiospermas con antecedentes de poseer metabolitos secundarios activos. El material de cada especie (parte aérea de la planta) se secó en una estufa con aire circulante a 40°C, se molió y se almacenó a 4°C en recipientes herméticamente cerrados hasta antes de su estudio.

De cada una de las especies colectadas se prepararon especímenes de herbario, los cuales se determinaron en el Herbario Nacional Colombiano (COL) del Instituto de Ciencias Naturales, en donde reposan los ejemplares con su respectivo número de radicación.

Recibido para su publicación: 24 de junio de 1997

Aprobada su publicación: 20 de agosto de 1997

Análisis fitoquímico preliminar

Se siguió la metodología expuesta por Sanabria (3) que se describe brevemente a continuación:

Se maceraron durante 12-15 horas 50 g. del material vegetal con 600 ml de etanol del 95% y luego se colocaron al reflujo durante 1 hora, se filtró al vacío en frío y el residuo se lavó con 100 ml de etanol.

Alcaloides: Se evaporó el solvente del extracto correspondiente a 15 g. de material vegetal seco, el residuo se extrajo con 20 ml de HCl al 5% a 50°C; en 4 tubos de ensayo se agregan 0,5 ml del extracto ácido y 2 gotas de los reactivos para alcaloides Dragendorff, Mayer, Valser y Reineckato de amonio. Si los resultados son positivos, el resto del extracto ácido se alcaliniza con NaOH al 20% y se extrae primero con CHCl_3 y luego con CHCl_3 -EtOH (3:2). Se evaporan los solventes y los residuos se extraen nuevamente con 3 ml de HCl al 5% y se hacen nuevamente las 4 reacciones de precipitación de alcaloides.

Esteroides y/o triterpenoides: El residuo del extracto etanólico correspondiente a 20 g. de material vegetal seco se extrajo con 2 porciones de 20 ml de éter de petróleo, se filtró, se concentró a 5 ml y en un embudo de separación se agitó con 10 ml de MeOH-H₂O (9:1); la fase etérea se separó por CCD bidimensional sobre sílica gel G eluyendo primero con ciclohexano-AcOEt (95:5) y luego con éter de petróleo-éter etílico-AcOH (80:20:1) y se reveló con el reactivo de Liebermann-Burchard (4) seguido de calentamiento a 105°C; la aparición de manchas nuevas con tonalidades del rojo, verde o azul indican la presencia de esteroides y/o triterpenoides.

El residuo de la extracción con éter de petróleo se extrajo con 20 y 10 ml de EtOH-H₂O (1:7) a 60°C, se filtró y se obtuvo la Solución 1.

Flavonoides: Con 1 ml de la Solución 1 se realiza la reacción de la Cianidina o Shinoda (coloración roja con Mg en polvo + HCl) la cual es positiva para γ -benzopironas. Las leucoantocianidinas se reconocen porque producen coloraciones rojas al calentar en b.m. por 15 minutos 1 ml de la Solución 1 y 0,5 ml de HCl.

Nafto y/o antraquinonas: Reacción de Bornträger-Krauss, calentar en baño de maría hirviendo 15 minutos 5 ml de la Solución 1, 1 ml de H₂O₂ de 20 volúmenes, 1 ml de H₂SO₄ al 50%, enfriar, extraer con 3 ml de benceno y agitar con 1 ml de NaOH al 5% que contiene 2% de NH₄OH; una coloración roja en la capa alcalina indica reacción positiva para estas sustancias.

Taninos: A 1 ml de la Solución 1 se le agrega 1 ml de reactivo de gelatina-sal (5), se centrifuga a 2.000 r.p.m. y el residuo se disuelve en 1-2 ml de solución 10 M de úrea, adicionar 2-3 gotas de FeCl₃ al 5%, con lo cual se obtienen coloraciones intensas rojo, azul o verde.

Saponinas: Las saponinas se reconocieron mediante la prueba de espuma y de hemólisis de glóbulos rojos siguiendo el procedimiento de Segelman y col. (5).

Lactonas terpénicas, cumarinas y cardiotónicos: El volumen de extracto etanólico equivalente a 10 g. de material vegetal seco se reduce a la mitad del volumen, se precipitan las clorofilas con AcOPb al 4% que contiene 0,5% de AcOH, el filtrado se concentra a 2/3 del volumen en evaporador rotatorio y se extrae 2 veces con 20 ml de CHCl_3 ; el extracto clorofórmico se deshidrata con Na₂SO₄, se concentra a 3 ml (Solución 2). Se aplica la Solución 2 en 4 placas cubiertas con sílica gel G junto con patrones de esteroides (colesterol, β -sitosterol), cumarinas (umbeliferona), lactonas terpénicas (helenalina) y cardenólidos (digitoxina). Dos placas se desarrollan con CHCl_3 -MeCOMe (90:10) y se revelan la primera con vainillina-ácido o-fosfórico (6) para terpenoides en general y sobre la segunda se practica la reacción del hidroxamato férrico (manchas anaranjadas al asperjar con mezcla de volúmenes iguales de clorhidrato de hidroxilamina al 2% en etanol y NaOH 2N, calentar por 15 minutos a 100°C, dejar enfriar y asperjar con una mezcla de volúmenes iguales de HCl 2N y FeCl₃ al 1%); las cumarinas se observan como manchas con fluorescencia verde o azul que dan positiva la reacción del hidroxamato férrico y no revelan con vainillina-ácido o-fosfórico, las lactonas terpénicas (diterpénicas y sesquiterpénicas) revelan con los 2 reactivos. Las otras 2 placas se desarrollan con CH_2Cl_2 -MeOH-H₂O (87:12:1) y se revelan una con vainillina-ácido o-fosfórico y la otra con reactivo de Raymond (manchas de color violeta al asperjar con m-dinitrobenceno al 2% en etanol y luego con NaOH al 2% en etanol del 50%); los cardenólidos revelan con estos dos reactivos.

Letalidad en larvas de *Artemia salina*

Los extractos se prepararon por maceración durante 24 horas de 15 g. de material vegetal pulverizado con 200 ml de etanol, seguido de agitación a 100 rpm por 2 horas a 40°C; se destiló el solvente a presión reducida (por debajo de 40°C), el residuo se secó al vacío y se guardó en desecador.

Para obtener las larvas de *A. salina* se agregaron 100 mg de huevos por cada litro de solución de sal

marina al 3% en agua destilada previamente oxigenada, siguiendo la metodología descrita por Medina y Mejía (7). En tubos de ensayo se adicionaron 10 nauplios y se completó a 5 ml con solución salina al 3% y a cada uno se agregaron 40 µl del extracto disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO), de tal manera que al final se obtuvieron concentraciones de 1,2; 2,0; 4,8; 10,0; 20; 48; 100; 160; 320 y 640 mcg/ml; como blanco se adicionaron 40 µl de DMSO, como patrones se utilizó colchicina, digitonina, sulfato de estricnina, clorhidrato de efedrina y cafeína a las mismas concentraciones; todos los ensayos se realizaron por quintuplicado.

Los resultados obtenidos se procesaron en un ordenador transformando los porcentajes de mortalidad en probits, los cuales se utilizaron para efectuar una regresión rectilínea que permitió calcular la CL₅₀ de los extractos y patrones con un intervalo de confianza del 95% (8,9).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 de la siguiente página se resumen los resultados más importantes del presente trabajo. Entre las 29 especies estudiadas, el 41% presentaron reacciones positivas para alcaloides, 97% para flavonoides, 59% para taninos, ninguna dio reacción para nafto y/o antraquinonas, 34% para saponinas, todas dieron reacción para esteroides y/o triterpenoides, 14% para lactonas terpénicas, 3% para cardiotónicos y 3% para cumarinas.

Los patrones presentaron los siguientes valores de CL₅₀ en mcg/ml (los valores encontrados por Meyer y col. (1) se dan entre paréntesis): Colchicina 1,2; digitonina 9; sulfato de estricnina 91 (77,2); clorhidrato de efedrina 233 (215) y cafeína 372 (306). Con el propósito de poder establecer alguna relación entre constituyentes químicos y letalidad sobre *A. salina*, se adoptaron los siguientes criterios:

Letalidad elevada	entre 0,1	-	100 mcg/ml
Letalidad moderada	entre 100	-	300 mcg/ml
Letalidad baja	entre 300	-	640 mcg/ml
Letalidad mínima	> 640 mcg/ml		

Entre las especies que contienen alcaloides todas, excepto *Bidens pilosa*, mostraron algún tipo de letalidad frente a *A. salina* dentro de los intervalos de concentración ensayados; entre estas presentaron una elevada letalidad *Ageratum conyzoides* (CL₅₀=2,0 mcg/ml) de la cual se han aislado alcaloides pirrolizidínicos de conocida toxicidad (10), *Heliopsis oppositifolia* (CL₅₀=13 mcg/ml), *Hamelia patens*, *Physalis peruviana* y *Austroepupatorium inulaefolium*; una moderada toxicidad

Arcytophyllum sp., *Conium maculatum* y *Solanum oblongifolium* y una baja toxicidad para *Tagetes caracasana*, *Solanum nigrum* y *Tropeolum majus*.

Las especies que contienen taninos muestran una letalidad sobre *A. salina* muy variada que oscila entre 2,3 mcg/ml para *Hipoestes sanguinolenta* y mayores de 640 mcg/ml en *Aragoa abietina* y *Pentacalia vaccinoides*.

La presencia de saponinas en las especies estudiadas no muestra una influencia especial sobre la letalidad en *A. salina* y así *Hyptis mutabilis* presentó una CL₅₀ de 2,6 mcg/ml, mientras que en *Aragoa abietina* fue mayor de 640 mcg/ml.

La presencia de lactonas terpénicas en las especies estudiadas muestra una gran incidencia en la letalidad de los extractos sobre *A. salina* y así las especies *Chromolaena odorata* y *Physalis peruviana* presentaron una elevada toxicidad y *Clibadium villosum* y *Tagetes caracasana* una moderada letalidad.

Las únicas especies con cardiotónicos (*Digitalis purpurea*) y cumarinas (*Critoniella acuminata*) presentaron letalidades moderadas sobre *A. salina*.

Con base en lo expuesto antes, en general, se puede afirmar que en las especies estudiadas se aprecia relación entre la presencia de algunos metabolitos secundarios y la letalidad sobre larvas de *A. salina*, especialmente de los alcaloides y las lactonas terpénicas. Sin embargo, es claro que la letalidad sobre *A. salina* depende de la concentración de las sustancias, de la presencia de otros metabolitos secundarios no analizados en este trabajo y de la interacción entre los mismos.

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional y a COLCIENCIAS por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a través del proyecto "Búsqueda de principios bioactivos en plantas medicinales colombianas" que dirige el doctor Roberto Pinzón.

BIBLIOGRAFIA

1. B.M. Meyer, N.R. Ferrigni, J.E. Putnam, L.B. Jacobsen, D.E. Nichols and J.L. McLaughlin, *Planta Medica* **45**, 31-34 (1982).
2. L. Lewan, M. Andersson and P. Morales-Gómez, *ATLA* **20**, 297-301 (1992).
3. A. Sanabria, "Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40

Tabla 1. Resultados de análisis fitoquímicos preliminares y de los ensayos de letalidad sobre larvas de *Artemia salina* de 29 especies vegetales

ESPECIE (Familia)	Alc. (a)	Fla (b)	Tan (c)	Naft Antr (d)	Sap. (e)	Est. Trit (f)	Lact Ter. (g)	Cum (h)	Card (i)	CL50 mcg/mL (j)
<i>Hypoestes sanguinolenta</i> (Aca)	0	2	2	0	0	2	0	0	0	2,3
<i>Conium maculatum</i> (Api)	1	2	2	0	1	3	0	0	0	203
<i>Ageratum conyzoides</i> (Ast)	3	2	0	0	0	3	0	0	0	2,0
<i>Austro eupatorium inulaefolium</i> (Ast)	2	2	0	0	0	2	0	0	0	46
<i>Bidens pilosa</i> (Ast)	1	0	2	0	0	2	0	0	0	> 640
<i>Chromolaena odorata</i> (Ast)	0	2	0	0	0	2	1	0	0	43
<i>Clibadium villosum</i> (Ast)	0	2	2	0	0	2	1	0	0	189
<i>Critoniella acuminata</i> (Ast)	0	2	2	0	0	3	0	3	0	184
<i>Diplotephium phyllicoides</i> (Ast)	0	2	2	0	0	3	0	0	0	344
<i>Heliopsis oppositifolia</i> (Ast)	3	2	2	0	0	1	0	0	0	13
<i>Pentacalia vaccinioides</i> (Ast)	0	2	2	0	0	1	0	0	0	> 640
<i>Tagetes caracasana</i> (Ast)	3	2	0	0	0	3	1	0	0	431
<i>Cavendishia bracteata</i> (Eric)	0	2	3	0	2	3	0	0	0	143
<i>Vaccinium floribundum</i> (Eric)	0	1	2	0	0	1	0	0	0	223
<i>Hyptis mutabilis</i> (Lam)	0	2	1	0	1	2	0	0	0	26
<i>Piper aduncum</i> (Pip)	0	2	0	0	0	2	0	0	0	46
<i>Piper bogotensis</i> (Pip)	0	2	0	0	+/-	3	0	0	0	291
<i>Monnina salicifolia</i> (Pol)	0	2	2	0	2	2	0	0	0	537
<i>Polygonum punctatum</i> (Pol)	0	2	2	0	0	2	0	0	0	38
<i>Arcytophyllum nitidum</i> (Rub)	0	2	0	0	0	2	0	0	0	5,5
<i>Arcytophyllum sp.</i> (Rub)	3	2	0	0	1	1	0	0	0	141
<i>Hamelia patens</i> (Rub)	3	2	2	0	0	2	0	0	0	40
<i>Aragona abietina</i> (Scro)	0	2	2	0	2	1	0	0	0	> 640
<i>Calceolaria chelidonioides</i> (Scro)	0	2	2	0	1	2	0	0	0	161
<i>Digitalis purpurea</i> (Scro)	0	2	0	0	0	2	0	0	+/-	257
<i>Physalis peruviana</i> (Sol)	3	2	1	0	1	3	1	0	0	42
<i>Solanum nigrum</i> (Sol)	3	2	0	0	1	3	0	0	0	437
<i>Solanum oblongifolium</i> (Sol)	3	1	0	0	0	3	0	0	0	241
<i>Tropaeolum majus</i> (Trop)	3	2	0	0	0	3	0	0	0	560

(0) Negativo (1) Escaso (2) Regular (3) Abundante (+/-) Prueba que debe confirmarse

(a) = Alcaloides; (b) = Flavonoides; (c) = Taninos; (d) = Nafto y/o Antraquinonas; (e) = Saponinas; (f) = Esteroides y/o Triterpenoides; (g) = Lactonas terpénicas; (h) = Cumarinas; (i) = Cardiotónicos; (j) = Concentración Mínima Letal.

Familias: (Aca) = Acanthaceae; (Api) = Apiaceae; (Ast) = Asteraceae; (Eric) = Ericaceae; (Lam) = Lamiaceae;

(Pip) = Piperaceae; (Pol) = Polygalaceae; (Rub) = Rubiaceae; (Scro) = Scrophulariaceae; (Sol) = Solanaceae; (Trop) = Tropaeolaceae

- plantas de la familia Compositae”, Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, 1983, 113 pp.
4. E. Stahl. “Thin-Layer Chromatography”, 2 Ed., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1969, p. 855.
 5. A.B. Segelman, N.R. Farnsworth and M.W. Quimby. *Lloydia* 32, 52-58 (1969).
 6. E. Stahl. “Thin-Layer Chromatography”, 2 Ed., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1969, p. 904.
 7. A. Medina y M.C. Mejía, “Actividad hipocolesterolémica en ratas del fruto de *Solanum melongena* (Berenjena)”. Tesis. Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 46 (1993).
 8. A. Salama, A.P. Hinestroza y M. Chaves. *Rev. Col. Cienc. Quím.-Farm.* N° 25, 44-51 (1996).
 9. H. Galván, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, comunicación personal, (1995).
 10. H. Windenfeld and E. Roeder, *Planta Medica* 57, 578-79 (1991).