

## ESTUDIO FITOFARMACOLOGICO DE *Senna spectabilis* (D.C) I&B

Blanca Meneses de Góngora,  
Jairo Calle Alvarez (1),  
Roberto Pinzón (1),  
Jorge Olarte,  
Luis Fernando Ospina (1),  
Silvia Bautista (1),  
Mariela Toscano de Pedraza (1),  
Luz Janneth Puentes.

### RESUMEN

Se realizó el estudio fitofarmacológico de *Senna spectabilis*. Se efectuó la extracción de los alcaloides de la corteza de la planta y se determinó su actividad farmacológica y su toxicidad. Se demostró un efecto anticoagulante de los alcaloides totales y se logró reproducir en el animal experimental las alteraciones hematológicas.

Los alcaloides muestran un aumento de la actividad motriz espontánea, inferior a la producida por la anfetamina, pero notoria en la dosis de 25 mg/Kg.

La administración de los alcaloides a los animales de experimentación produce, además, convulsiones. Se determinó en ratones la  $DL_{50}$  de los alcaloides totales, obteniéndose un resultado de 31 mg/Kg de peso. Se efectuó un estudio histopatológico de algunos órganos de las ratas y ratones utilizados en los ensayos de actividad farmacológica y se observaron daños ocasionados por la administración de los alcaloides totales.

### SUMMARY

Alkaloids extraction from the bark of *Senna spectabilis* was made and their pharmacological and toxicological activities were evaluated. An anticoagulant effect, as well as hematological alterations in the experimental animals were demonstrated. In addition, the alkaloids at a dose of 25 mg/Kg exhibited notorious elevation of spontaneous motile activity, lower than that produced by amphetamine. The  $LD_{50}$  of the alkaloids in mice was 31 mg/Kg, a histopathological study of some organs from the mice and rats to which alkaloids were administered showed damage.

### INTRODUCCION

La *Senna spectabilis* (velero, cañafístulo macho) se encuentra distribuída en gran parte del territorio colombiano. Basados en la observación de los efectos tóxicos que produce el aserrín de la madera de la planta, el cual irrita las mucosas oculares y respiratorias y origina epistaxis en los carpinteros que trabajan esta madera, se

(1) Departamento de Farmacia,  
Universidad Nacional de Colombia,  
A.A. 14490, Santafé de Bogotá.

escogió esta planta como objeto del presente estudio con el fin de determinar su actividad biológica y las sustancias responsables de la misma.

En un estudio anterior, Reguero y Calle aislaron e identificaron del extracto etanólico de la corteza de esta planta, dos alcaloides de tipo piperidínico: cassina y cassinicina (1).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Aspectos Fitoquímicos

**Recolección del material vegetal:** La corteza de *Senna spectabilis* se recolectó en el municipio de Fusagasugá, a una altura de 1800 m.s.n.m. a una temperatura de 18°C. El ejemplar correspondiente a esta especie, se encuentra registrado en el Herbario Nacional Colombiano, con número de colección 344922.

**Extracción de los alcaloides:** La corteza recolectada se secó a 50°C durante 24 horas. El material seco se pulverizó y se tomaron 2000 g que fueron macerados con éter de petróleo con el fin de desengrasar el material vegetal. El residuo se sometió posteriormente a una extracción con alcohol al 96%; este extracto se concentró hasta sequedad y se procedió a la obtención de los alcaloides.

Para obtener los alcaloides, se le adicionó HCl al 5% al extracto etanólico seco, se filtró y se alcalinizó con NaOH al 10%; se extrajo con cloruro de metileno, filtrando y evaporando hasta obtener los alcaloides totales.

## ESTUDIO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

**Animales de experimentación:** Se emplearon ratones albinos machos, provenientes de una colonia

suiza ICR, con un peso entre 28 y 30 g y edad de 45 a 50 días y ratas hembras [cepa Fisher 344] con 200 a 220 g de peso y edad aproximada de 12 semanas. Todos los animales se sometieron a un período de acondicionamiento de 15 días y se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, iluminación, fotoperíodo y esquemas de sanitización de su micro y macroambiente

### Preparación de las soluciones para los ensayos de actividad biológica:

**Alcaloides totales:** Para disolver los alcaloides totales se utilizó el vehículo Agua:Polietilenglicol 200:Tween 80 (60:38:2).

**Sustancias patrones:** Se usaron como fármacos de referencia: anfetamina, diazepam, fenitoina y fenobarbital, disueltos en solución salina.

**Toxicidad aguda:** Para la determinación de la  $DL_{50}$  de los alcaloides totales se emplearon ratones machos de 45 días y con peso entre 28 y 30 g ; los ratones se distribuyeron en 10 grupos de 7 animales cada uno y se sometieron a ayuno previo de 15 horas. Se les administró por vía intraperitoneal dosis de alcaloides de 19.2, 23, 27.7, 33.3, 40 y 48 mg/Kg. A cada grupo se le administraron las dosis y a los controles, el vehículo. Se hizo observación general de la sintomatología que se presentaba en cada grupo y se registró el número de muertes durante un período de 15 días. La  $DL_{50}$  se determinó experimentalmente con base en respuestas cuantales y se calculó aplicando el método estadístico de Bliss (2), el método matemático de Red and Muench y el método gráfico de la curva en espejo (3).

**Tamizado hipocrático:** Se realizó siguiendo la metodología reportada por Sandberg (4). Las observaciones se realizaron a los 5, 15, 30 y 60 minutos después de la administración intraperitoneal de cada una de las sustancias. Se administraron a cada grupo de 6 ratas las dosis de alcaloides 25, 50, 100 y 500 mg/Kg .

### **Pruebas neurofarmacológicas:**

**Test de Irwin:** Se administraron dosis de 25, 20 y 15 mg/Kg de peso a grupos de 10 ratones. Se emplearon como sustancias patrones anfetamina y diazepam, se siguió la metodología descrita por Turner (5). Se observó el comportamiento de los animales y la actividad neurológica y autonómica.

**Actividad motriz espontánea:** Se usó un actógrafo electrónico que permite obtener registros de la actividad motriz de los animales por un tiempo determinado. A todos los animales se les tomó un registro normal durante un minuto antes de la administración de los compuestos; después de la inyección por vía intraperitoneal, se registró la actividad motriz por un minuto cada 15 minutos durante una hora. Se utilizaron 3 ratones por dosis de 25 y 15 mg/Kg de peso.

**Efecto convulsivante y su antagonismo:** Se evaluó el efecto protector del fenobarbital, el diazepam y la fenitoina frente a las convulsiones producidas por los alcaloides totales. Se emplearon grupos de 15 ratones por cada sustancia anticonvulsivante. A cada grupo se le administró por vía intraperitoneal el fármaco anticonvulsivante respectivo, y una vez transcurrido el tiempo de absorción se procedió a administrarles una dosis de 48 mg/Kg de alcaloides totales.

**Estudio histopatológico:** Se llevó a cabo en tres ratones y tres ratas, tomados al azar de los grupos de animales utilizados en la determinación de la  $DL_{50}$  y del tamizado hipocrático. Los grupos escogidos fueron los correspondientes a las dosis de 33, 40 y 48 mg/Kg de la  $DL_{50}$  en el caso de los ratones y dosis de 50, 100 y 500 mg/Kg del tamizado hipocrático con ratas. A todos los animales se les practicó la necropsia, se tomaron muestras de los órganos internos y se prepararon para el examen microscópico según la técnica de Geneser (6).

**Pruebas de coagulación sanguínea:** Se emplearon grupos de 3 ratas y se administraron por vía

intraperitoneal dosis de alcaloides totales equivalentes a 25,50 y 100 mg/Kg. Los controles normales se hicieron, a cada rata, antes de la administración.

**Tiempo de coagulación:** Se hizo una punción moderadamente profunda en el plexo ocular venoso de la rata con un tubo capilar no heparinizado. Una vez lleno el tubo se partió en porciones de un centímetro a intervalos de un minuto hasta la aparición de un hilo de fibrina en los extremos de las porciones de tubo separadas. El intervalo entre la toma de la muestra y la formación del hilo de fibrina se registró como tiempo de coagulación (7).

**Tiempo de protrombina:** Se tomó 1 mL de sangre del plexo ocular venoso de la rata con un capilar sin heparinizar, se añadió a un tubo de centrifugación cónico graduado que contenía 0.1 mL de citrato de sodio al 3.8% y se centrifugó. El plasma obtenido se llevó al baño maría a 37°C, se tomó 0.1 mL de plasma, se le adicionó 0.2 mL de tromboplastina y se determinó el tiempo de formación del coágulo; como control, se utilizó un plasma normal, el cual se sometió a esta prueba simultáneamente con las muestras (8).

**Recuento de plaquetas:** El recuento de plaquetas se hizo en extendidos de sangre teñidos con el colorante Wright. Se contaron 100 leucocitos y el número de plaquetas halladas en los mismos campos. Se calculó el número absoluto de plaquetas por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de plaquetas} \times \text{N}^\circ \text{ total de leucocitos} / \text{mm}^3}{100 \text{ leucocitos}} = \text{N}^\circ \text{ de plaquetas} / \text{mm}^3$$

## RESULTADOS

### Aspectos Fitoquímicos

**Extracción de los alcaloides totales:** De 2000 g de corteza pulverizada de *Senna spectabilis* se obtuvieron por extracción con etanol 297.5 g de extracto, y a partir de este extracto se obtuvieron 6.2 g de alcaloides totales (rendimiento 0.3%).

### ESTUDIO FARMACOLOGICO

**Toxicidad aguda:** Determinación de la  $DL_{50}$  de los alcaloides totales. La sintomatología observada a dosis inferiores fue: inquietud, aumento de la motilidad espontánea, aumento de la actividad exploratoria y, en algunos casos, dificultad respiratoria. A dosis altas se observó inquietud, irritabilidad, aumento notorio de la actividad motriz seguida por estados ligeros de quietud, arrastre del tren posterior, relajación abdominal, dificultad respiratoria, temblores y finalmente, fuertes convulsiones clónicas que preceden a la muerte del animal. La  $DL_{50}$  determinada por el método de Red and Muench corresponde a 29.50 mg/Kg. La  $DL_{50}$  determinada por el método gráfico de la curva en espejo indica un valor de 31.12 mg/Kg.

**Tamizado hipocrático (1):** Las dosis de 500, 100 y 50 mg/Kg de los alcaloides resultaron ser letales en los 15 minutos iniciales; con las dosis de 25 mg/Kg se observaron los efectos farmacológicos que permitieron la realización de este ensayo.

Con la muestra de los alcaloides totales se encontró que hay un aumento en la actividad motora a los 5 minutos, que continúa aumentando hasta los 45 minutos y luego disminuye. A los 5 minutos de administrados los alcaloides se presenta reacción de alarma que empieza a disminuir a los 45 minutos; además, hay erección de la cola a los 30 minutos y erección pilomotor a los 15 minutos. Los animales se tornaron un poco agresivos.

### Pruebas neurofarmacológicas:

**Test de Irwin:** La administración de los alcaloides totales produce una estimulación central, lo cual causó un aumento de los siguientes parámetros: estado de alerta, reactividad, fuerza prensil y actividad motora; además se presentó intranquilidad e irritabilidad.

**Actividad motriz espontánea:** Los alcaloides muestran un aumento de la actividad motriz espontánea, inferior a la producida por la anfetamina pero notoria en la dosis de 25 mg/Kg. La dosis de 15 mg/Kg no produce efecto sobre esta actividad. La anfetamina muestra su efecto después de 30 minutos de absorción; el diazepam y los alcaloides lo presentan más rápidamente.

**Efecto convulsivante y su antagonismo:** Uno de los síntomas característicos de la intoxicación por los alcaloides de la *Senna spectabilis* fue la presencia de convulsiones. El diazepam, el fenobarbital y el difenilhidantoinato sódico no protegieron en un 100% el efecto estimulante central de los alcaloides. Con el diazepam no se presentaron las convulsiones pero sí la muerte; la ausencia de convulsiones se puede atribuir al efecto protector que exhibe este fármaco. El fenobarbital disminuyó la intensidad convulsiva pero no evitó la muerte. Con el difenilhidantoinato sódico se presentaron convulsiones fuertes y muerte súbita.

**Estudio histopatológico:** Encontramos congestión generalizada y en algunos casos edema en los órganos a los cuales se les practicó la necropsia. Se observó congestión hepática generalizada y congestión pulmonar.

**Coagulación sanguínea:** Con las dosis de 50 y 100 mg/Kg de alcaloides, las muestras no coagulan en el tiempo límite superior que se fija para estas pruebas y solamente con la dosis de 25 mg/Kg se logró tomar el tiempo para ambos ensayos. Sin embargo, estos tiempos están por encima del valor determinado para los mismos animales, antes de administrarles las correspondientes dosis de alcaloides.

El recuento de plaquetas realizado después de la

administración de los alcaloides mostró un descenso importante en relación con el recuento obtenido antes de administrar los alcaloides.

## DISCUSION

Los efectos farmacológicos observados en animales de experimentación fueron reproducibles tanto en el Test de Irwin (ratones) como en el Test Hipocrático (ratas) y permitieron evidenciar no solo la marcada toxicidad de los alcaloides (congestión generalizada en hígado, pulmones, SNC, etc), sino la clasificación preliminar de los efectos globales como del tipo "estimulante del Sistema Nervioso Central", basados en la comparación con patrones de actividad central como el Diazepam (depresor) y la Anfetamina (estimulante).

La estimulación del SNC se manifestó en alteraciones del comportamiento psicomotriz del animal experimental, contemplando desde aumento del estado de alerta, de la intranquilidad y la irritabilidad, de la fuerza prensil y la actividad motora, hasta la convulsión (máxima excitación del SNC). Esta actividad convulsivante no pudo ser contrarrestada por agentes antiepilépticos usuales como el Diazepam, la Difenhidantoina o el Fenobarbital. En esta etapa de la investigación no se pudo establecer un posible mecanismo pro-convulsivante de los alcaloides.

## CONCLUSIONES

\* Se comprobó que los alcaloides totales presentes en la corteza de *Senna spectabilis* poseen un margen muy estrecho entre la  $DL_{50}$  y la dosis efectiva para producir efectos farmacológicos y son los compuestos responsables de la toxicidad observada.

\* El aumento en el tiempo de protrombina y en el tiempo de coagulación sanguínea, media dos al parecer por el daño hepático, así como la disminución en el número de plaquetas, fueron alteraciones que

evidenciaron la bioactividad hematológica de los alcaloides de *Senna spectabilis*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó dentro del Programa de Investigación "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas", financiado por Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia.

## BIBLIOGRAFIA

1. M.T. Reguero, J.Calle. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 16 (3), (1985).
2. C.I. Bliss, "The Statistics of Bioassay", Academic Press, 1952.
3. F.Luna, C.Maldonado. Selección de Técnicas Neurofarmacológicas para identificar sustancias con actividad sobre el Sistema Nervioso Central. Evaluación de un extracto de *Senecio vaccinoides*. Tesis para título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de Colombia. (1989).
4. F.Sandberg, Tamizado Farmacológico de Plantas Medicinales. en "Manual de Técnicas de Investigación". Proyecto X-1. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. CYTED, (1995).
5. R.Turner, "Screening Methods in Pharmacology", Academic Press, 1965, pp 89-112.
6. F.Geneser, "Histología", Editorial Médica Panamericana S.A., 1984, pp 44-45, 55-61.
7. R.Barreiro, "Conferencias de Patología Clínica Veterinaria", Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia, 1989, pp 72-73.
8. J.B. Miale, "Hematología", Editorial Reverté S.A., 1985, pp 869, 1037-1038.