

Actividad antiinflamatoria, dosis letal 50 y estudio fitoquímico preliminar de cucumis anguria

AHMED M. SALAMA *
LYA DUQUE NAVARRO *
FRANCY E. DÍAZ B. *

RESUMEN

En el presente trabajo, el análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de los tallos con hojas, frutos verdes y frutos maduros mostró la presencia de taninos, esteroides, triterpenos, además los tallos con hojas y los frutos maduros contienen saponinas. Los extractos alcohólicos y acuosos de los órganos de la planta manifestaron un efecto antiinflamatorio alto y las pruebas toxicológicas agudas no presentaron alteración en los animales de experimentación.

SUMMARY

In the present work, the phytochemical screening of the alcoholic extracts of the young stem with leaves, immature and mature fruits, showed the presence of sterols, triterpenes, and tannins, also the presence of saponins in the extracts of young stem with leaves and of mature fruits. A high antiinflammatory effect of the alcoholic and aqueous extracts of all organs of the plants was shown. The acute toxicological test did not show alteration in the experimental animals.

INTRODUCCION

La revisión bibliográfica sobre las especies de la familia Cucurbitaceae mostró la presencia de esteroides, (1,2), triterpenos (3,4,5), flavonoides (6), alcaloides (7,8), aminoácidos y proteínas (9,10), ácidos grasos (11,12), compuestos fenólicos (13), vitaminas (14,15) y otros elementos (16, 17, 18).

Uno de los pocos estudios reportados de *Cucumis anguria* fue realizado por Lucena en 1942 (19) mostrando por estudios

farmacológicos la presencia de vitamina B 2 y B 6. Según estudios realizados, varias plantas de la familia Cucurbitaceae, a la cual pertenece la *C. anguria*, poseen actividad antiinflamatoria (20,21,22), antitumoral (3,23), además han sido muy empleadas en medicina popular (24,25).

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Los tallos con hojas, frutos verdes y frutos maduros fueron recolectados en la finca Mi Bohío, carretera que conduce a Arbelaez, Departamento de Cundinamarca, a 700 metros sobre el nivel del mar.

La planta fue clasificada por el Doctor Thomas W. Whitaker. Un ejemplar quedó archivado en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número Col. 264847.

Estudio fitoquímico

Para la obtención de los extractos etanólicos, se tomó 100 gm. de tallos con hojas, de frutos verdes y de frutos maduros por separado que fueron extraídos con etanol del 96%, dejándolos en maceración por 24 horas. Posteriormente fueron sometidos a reflujo y filtración al vacío. Los extractos fueron concentrados obteniéndose residuos secos de 9.26, 16.35 y 15.35 gm respectivamente, los residuos obtenidos fueron sometidos a un estudio fitoquímico preliminar (26).

ESTUDIO FARMACOLOGICO

Preparación de extractos

Se tomaron 50 gm. de material vegetal en polvo de cada uno de los órganos de la planta, los cuales fueron extraídos por maceración con etanol al 96% en un equipo Soxhlet. Se obtuvieron residuos secos de 5.56 mg. para los tallos con hojas, 9.29 gm. para los frutos verdes y 8.87 gm. para los frutos maduros. Igualmente por maceración con agua de 50 gm de los mismos órganos de la planta se obtuvieron 2.78, 6.52 y 4.82 gm. respectivamente.

* Universidad Nacional, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Teniendo en cuenta el análisis de los resultados del ensayo preliminar se escogieron las dosis de 50 y 100 mg/kg ya que a estas dosis el efecto antiinflamatorio se mantiene o aumentan en la tercera hora de haber administrado el agente flogístico tanto para los extractos alcohólicos como para los acuosos. Siguiendo el método de Winter y Col. (27) y un sistema de medidas diseñado por Salama y Col. (28), que consta de un aparato de vidrio provisto de un tubo ancho de 2.5cm. de diámetro, sellado en el extremo inferior que posee un desprendimiento lateral en la parte superior.

El tubo se llena con mercurio, el cual se desplaza por el volumen de la pata de la rata y pasa a través del desprendimiento lateral para ser medido en una bureta pyrex de 10 x 0.05 ml.

A grupos de 10 ratas con un peso de 250 ± 20 gm. para cada dosis de cada extracto, patrón y control se les administraron, los extractos acuosos en agua destilada, extractos alcohólicos, indometacina (5 mg/kg), fenilbutazona (65 mg/kg) en forma de suspensión en tween 80 al 0.1% en agua destilada. Como blanco y control se empleó agua destilada y tween 80 en agua destilada respectivamente en dosis de 40 ml/kg. Después de la administración de los extractos o patrones se suministró agua destilada en un volumen equivalente a 40 ml/kg con el fin de proporcionar una hidratación uniforme en las ratas y minimizar la variabilidad de la respuesta edematosa en sus patas.

Una hora después de administrar los extractos, patrones, los vehículos y blancos se introdujo la pata posterior derecha de la rata hasta una zona demarcada previamente en el tubo del aparato de medida que contienen el mercurio. Se determinó por triplicado el volumen del mercurio desplazado (D_0). Simultáneamente se inyectó 0.05 ml. de una suspensión recién preparada del agente flogístico (carragenina al 1% en solución salina) en la región metatarsiana de la pata posterior derecha de las ratas.

A la hora y a las tres horas de la administración de la carragenina, se introdujo la misma pata de la rata hasta la zona demarcada, en el tubo de mercurio para determinar por triplicado el volumen desplazado. El promedio de los tres valores corresponden a D_1 y D_3 respectivamente

Se tomó como 100% de inflamación la producida en las ratas que recibieron los blancos (agua destilada). $D_1 - D_0$ como variación de desplazamiento del mercurio a una hora de la administración de la carragenina. $D_3 - D_0$ corresponde a la variación de desplazamiento del mercurio a las 3 horas de administrar la carragenina. El porcentaje de inhibición de la inflamación se calculó según la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \frac{A}{B} \times 100$$

$A = D_1 - D_0$ o $D_3 - D_0$ del problema o patrón a una hora o 3 horas de la administración de la carragenina.

$B = D_1 - D_0$ o $D_3 - D_0$ del blanco a una hora o las tres horas de la administración de la carragenina. Los resultados se encuentran en las gráficas No. 1 y 2.

Determinación de la dosis letal 50

La DL50 de los extractos alcohólicos de los frutos verdes y frutos maduros, se determinó en 10 grupos de 7 ratones blancos, cepa I.C.R. de 5 semanas con peso de 20 ± 25 gm. por cada extracto y un grupo del mismo número de ratones como control. Los extractos fueron administrados por vía intraperitoneal en tween 80 al 0.5% en solución salina, en dosis de 5000, 5500, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 mg/kg (extracto alcohólico de frutos verdes), 7000, 9000, 12000, 15000, 18000 mg/kg (extracto alcohólico de frutos maduros). Se siguió el procedimiento de acumulación de los datos observados, durante un periodo de 15 días y para el cálculo matemático de la DL50 se empleó la siguiente fórmula de Reed y Muench (29).

$$\text{Log DL50} = \text{Log DI} + \text{Log } r \frac{50 - \text{MI}}{\text{MS} - \text{MI}}$$

DI = Dosis inferior al 50% de mortalidad.

r = Relación entre la dosis superior al 50% de mortalidad y la dosis inferior al 50% de mortalidad.

MI = Mortalidad inferior al 50%

MS = Mortalidad superior al 50%

Determinación de la toxicidad aguda

El ensayo se realizó mediante la administración de dosis únicas de 2000, 400 y 100 mg/kg para el extracto alcohólico de los frutos verdes y 4000, 800 y 200 mg/kg para el extracto alcohólico de los frutos maduros por vía intraperitoneal y vía oral, a grupos de 7 ratones blancos, cepa I.C.R., de cinco semanas, con un peso de 20-25 gm, para cada dosis de cada extracto y cada vía de administración. Se emplearon dos grupos de ratones para el control (vehículo). Una vez suministrados los extractos y vehículo se observó la sintomatología presentada por los ratones diariamente durante un periodo de 15 días.

Finalmente los ratones se sacrificaron para examinar posibles efectos de los extractos sobre los principales órganos como el hígado, riñón, pulmón, corazón y bazo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio fitoquímico

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de los tallos con hojas, de frutos verdes y de frutos maduros demostró la presencia de taninos, esteroides y triterpenos. Además los extractos alcohólicos de los tallos con hojas y de los frutos maduros contienen saponinas.

Actividad antiinflamatoria

Con el propósito de seleccionar la dosis a la cual se presenta una respuesta antiinflamatoria se realizó un ensayo preliminar, empleando dosis de 50, 100 y 150 mg/kg. de cada extracto. Los resultados muestran una relación directa entre la dosis administrada y el efecto antiinflamatorio a la primera hora de la administración de la carragenina (agente flogístico). A la tercera hora, la relación directa se conserva solo para las dosis de 50 y 100 mg/kg. y el efecto antiinflamatorio disminuye para las dosis de 150 mg/kg. Con base en lo anterior se escogieron las dosis de 50 y 100 mg/kg para evaluar la actividad antiinflamatoria.

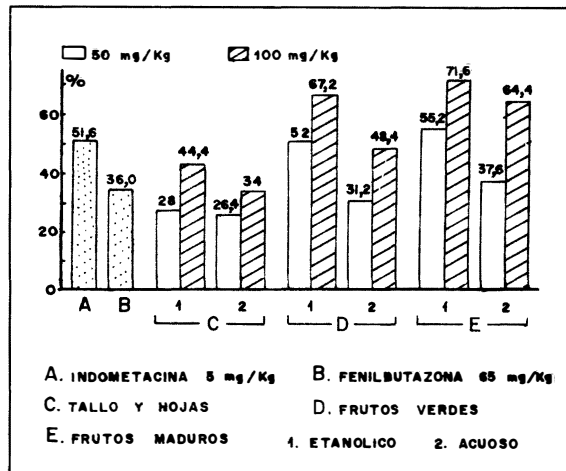
Teniendo en cuenta las diferencias químicas entre un extracto acuoso y otro alcohólico se evaluó la actividad antiinflamatoria para ambos extractos de los órganos de la planta. Los extractos acuosos fueron administrados en agua destilada mientras que los extractos alcohólicos fueron administrados en forma de suspensión en Tween 80 al 0.1% en agua destilada. Los resultados de ensayos de control en los cuales fue administrado solamente el vehículo, son idénticos con los resultados de los blancos (agua destilada) y no presentaron efecto antiinflamatorio.

Con fines comparativos se emplearon las sustancias patrones indometacina (5 mg/kg) y fenilbutazona (65 mg/kg.) obteniendo porcentajes de inhibición de la inflamación de 51.6 y 70% para la primera sustancia, 36 y 51% para la segunda sustancia, a la primera y tercera hora respectivamente.

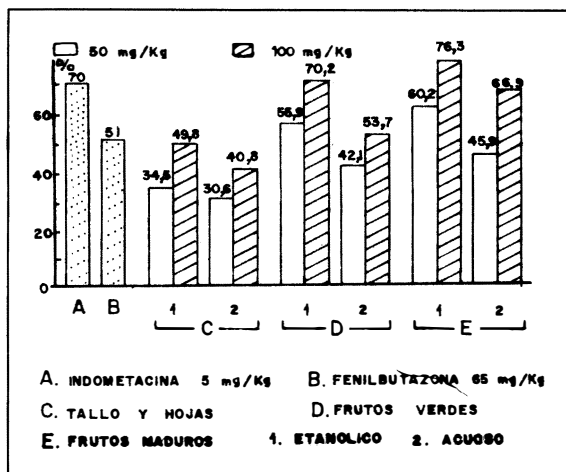
Los resultados de la evaluación de la propiedad antiinflamatoria demostraron un efecto alto para la mayoría de los extractos de la planta. Los mejores resultados se obtuvieron con la dosis de 100 mg/kg.

Con el fin de facilitar la comparación entre el efecto antiinflamatorio de los diferentes extractos de los órganos de la planta y de los patrones empleados, se elaboraron gráficas de barras (Gráficas 1 y 2).

En general y como se observa en las gráficas 1, 2, los extractos etanólicos de los frutos maduros y frutos verdes



GRAFICA No.1: Barras comparativas de los porcentajes de inhibición de la inflamación de los patrones y extractos de la primera hora.



GRAFICA No.2: Barras comparativas de los porcentajes de inhibición de los patrones y extractos de la tercera hora.

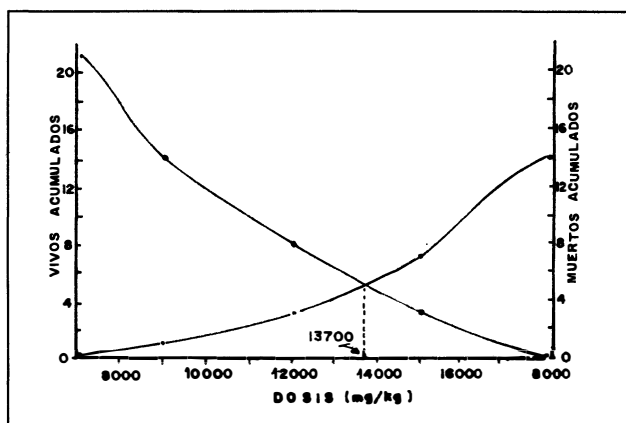
mostraron mayor efecto antiinflamatorio con las dosis de 100 mg/Kg, comparándolos con la indometacina (5 mg/Kg) y fenilbutazona (65 mg/Kg).

Los extractos etanólico y acuoso de los tallos con hojas mostraron el menor efecto antiinflamatorio. Para cada órgano analizado de *C.anguria* se encontró que el mayor efecto antiinflamatorio se presenta en el extracto alcohólico comparado con el extracto acuoso, probablemente esto se debe a que el etanol posee una mayor capacidad de extracción de los constituyentes que el agua. También de las gráficas podemos observar que a las dosis ensayadas (50 y 100 mg/kg) después de una hora y tres horas de administrar el agente flogístico, el efecto antiinflamatorio en orden decreciente es así: frutos

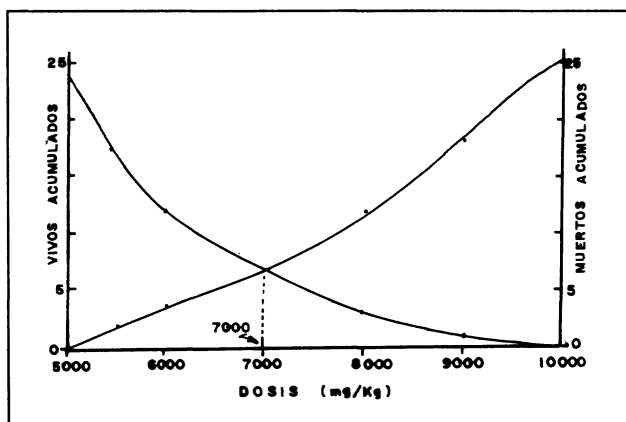
maduros (extracto alcohólico), frutos verdes (extracto alcohólico), frutos maduros (extracto acuoso), frutos verdes (extracto acuoso), tallos con hojas (extracto alcohólico) y tallos con hojas (extracto acuoso).

Toxicidad y dosis letal 50 de los extractos

Se decidió realizar el estudio de toxicidad únicamente para los extractos alcohólicos de los frutos maduros y frutos verdes que presentaron el mayor efecto antiinflamatorio en las dosis de 50 y 100 mg/kg. Las dosis calculadas de extractos que producen una mortalidad del 50% de la población de ratones utilizados, administrados por vía intraperitoneal fueron 14186 mg/kg para extracto alcohólico de frutos maduros y 7233 para extracto alcohólico de frutos verdes. El punto de corte obtenido gráficamente (Gráficas 3 y 4) es 13700 mg/kg y 7000 mg/kg respectivamente. De acuerdo con Casarett and Doull's (30) estos extractos podían catalogarse como no tóxicos.



GRAFICA No.3: Método gráfico para determinar el valor de la DL50 del extracto etanólico de los frutos maduros de *cucumis anguria*.



GRAFICA No.4: Método gráfico para determinar el valor de la DL50 del extracto etanólico de los frutos verdes de *cucumis anguria*.

La sintomatología observada en los ratones por la administración de los extractos por vía intraperitoneal fue una depresión con las dosis de 2000 y 400 mg/kg del extracto de los frutos verdes y de 4000 y 800 mg/kg del extracto de los frutos maduros. Por la vía oral para el extracto alcohólico de los frutos verdes en dosis de 2000 y 400 mg/kg se observó solamente un ablandamiento en las heces y un incremento en la defecación y micción que persistió durante 3 días. La inspección macroscópica de los órganos de los ratones no demostró alteraciones.

BIBLIOGRAFIA

1. MASHCHENKO, N.E., *Tezisy Dokl. Soobshch-konf. Malodykh. Mold.*, 9th, **102**, (1975).
2. KHAN, M.A., ZEHRA, F., *Pak. J. Sci. Ind. Res.*, **18**, 12, (1976).
3. ATTA - UR - RAHMAN, AHMED V.U., KHAN, M.A., ZEHRA, F., *Phytochemistry*, **12**, 2741. (1973).
4. RODRÍGUEZ, B., MARTÍN, F., *An. Real Soc. Espan. Fis. Quim. Ser. B.*, **63**, 959. (1967).
5. KINTYA, P. K., ISAEVA, N. E., CHIRVA, V., LAZAR EVSKII, G., *Khim. Prir. Soedin.*, (3), 306. (1972).
6. LINARD, A., PARIS, R.R., *Plant Med. Phytother*, **11**, 270. (1977).
7. GULABOV, A. Z., VENKOV, A.P., NAUCH. TR., *Vissh Pedagog. Inst. Plovdiv. Mat. Biol.*, **8**, 137. (1970).
8. SAYED, M.D., BALBAA, S.J., AFIFI, M.S., *Planta Médica*, **24**, 260. (1973).
9. CHELLIAH, S., SAMBONDAM, C.N., *Labder part B.*, 11B (3-4), 41. (1973).
10. AYKAZYAN, V. Ts., MARKOSYAN, K.A., NALBAN DYAN, R.M., *Biokhimiya*, **39**, 1184. (1974).
11. BHATIA, I.S., GUPTA, B.K., PAUL, Y. SUKHIJA, P.S., *Plant Biochem. J.*, **4**, 47. (1977).
12. SHALABY, A.F., YOUSSEF, M.M., DOAIGEY, A.R., *J. Fac. Sci., Riyad Univ.*, **10**, 39. (1979).
13. RAO, M.M., LAVIE, D., *Tetrahidron*, **30**, 3309. (1974).

14. FUJITA, A., EBIHARA, T., *Biochem. Z.*, **290**, 201. (1937).
15. HARRIS, R.S., PROCTOR, B.E., GOLDBLITH, S., BRODY, J., *Proc. Ist. Food conf. Inst. food Tech.*, **1**, 109. (1940).
16. SHIRAHAMA, K., SHIMIZU, J., *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **8**, 4. (1932).
17. SHTENBERG, A.I., *Vaprosy Pitaniya*, **10**, 29, (1971).
18. PECNIK, E., GUIMARAES, L.R., *Ara. Brasil. Natr.*, **21** 17, (1965).
19. LUCENA, J., *Neurobiol.*, No. (2). 89. (1942).
20. SALAMA, A.M., POLO, A.E., MARTÍN, M., MARTÍNEZ, A., *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, No. 15, 59. (1986).
21. SALAMA, A.M., POLO, A.E., CONTRERAS, G., MALDONADO, L., *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, No. 15, 79. (1986).
22. NAIK, U.R., AGSHIKAR, N.V., ABRAHAM, G.J., *Pharmacology*, **20**, 52, (1980).
23. BATIA, S., GITTER, S., *Cancer Chemotherapy report*, **23**, 19. (1962).
24. ERSPAMER, V., *Riv. Ital. Essenze Produmi Painte Offic. Olli. Vegetali. Saponi*, **28**, 264, (1947).
25. KUSSNER, W., KREITMAIR, H., *E. Merck's Jahresber*, **52**, 352. (1939).
26. SANABRIA GALINDO, A., Análisis fitoquímico preliminar, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Bogotá, (1983).
27. WINTER, C.A., RISLEY, E. A., NUSS, G. W., *Proc. Soc. Exp. Biolo., N.Y.*, **11**, 544. (1962).
28. SALAMA, A.M., POLO, A.E., LEÓN TORRES, A., MEDINA TORRES, C., RIVERA, A., *Rev. Colomb. Cienc. Quimi. Farm.* No. 17, 63. (1989).
29. KECAN, G., HERRERA, A., *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **1**, 41, (1970).
30. Casarett and Doull's, *Toxicology the basic science of poisons*, 2 ed. New York, U.S.A., Mc Millan publishing Co. Inc., 12. (1980).