

SELECCION DE LA ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DEL EXTRACTO ETEREO PURIFICADO DE LAS FLORES DE *Spilanthes americana*

Affe Mrad de Osorio*
Luz Stella Ospina de Nigrinis*
Nora C. Torres R.*
Jairo A. Ussa H.*

RESUMEN

Se realizó una selección farmacológica con el extracto etéreo purificado de las flores *Spilanthes americana*. Se comprobó la actividad anestésica local del extracto y se observó además que produce estimulación a nivel de sistema nervioso central, al igual que otros anestésicos locales. También se evidenció una clara acción colinérgica tanto en las preparaciones de órganos aislados como en el animal íntegro. Se determinó la D.L. 50 en ratones.

SUMMARY

Apharmacological screening with the purified extract of the flowers of *Spilanthes americana* was made. It was checked its local anesthetic activity, and the same as many local anesthetic, a Central Nervous System stimulation was observed. Furthermore, it was evidenced a clear cholinergic action with "in vitro" preparations as well as with intact animals. The LD-50 in ICR male mice was determined.

INTRODUCCION

En la investigación farmacológica de nuevos compuestos químicos o de preparados de origen natural, es indispensable la realización de un determinado número de pruebas que permitan establecer un perfil farmacológico general de la sustancia en cuestión. Para tal fin debe disponerse de "una amplia batería de ensayos de diversas actividades farmacológicas, a través de las cuales puede ser definido un primer perfil farmacológico de una sustancia de actividad desconocida" (1).

Esto es lo que denominamos una selección, tamizado, o "screening" farmacológico. Para que estas pruebas sean útiles deben cumplirse ciertas condiciones como la sencillez de su realización, la utilización de especies de animales de pequeño tamaño y fácilmente asequibles, que no exijan el empleo de instru-

mentos complicados y costosos e impliquen un gasto mínimo del compuesto o del extracto a analizar, que su ejecución sea rápida y que sean suficientemente significativas de la actividad que se valora (1).

Las anteriores consideraciones para el caso de los productos naturales son de gran importancia dado el uso popular tan extendido en nuestro medio de preparados de las llamadas plantas medicinales. Un ejemplo de esto es la *Spilanthes americana*, planta objeto de este estudio, cuyas flores son usadas ampliamente en medicina popular como cicatrizante y para el tratamiento de aftas bucales (2), actividades que fueron estudiadas por Ospina de Nigrinis, L.S. (3) quien determinó también la actividad anestésica local de un compuesto aislado de las flores de la planta. Este estudio, centrado en la obtención de información de la actividad farmacológica del extracto etéreo purificado de las flores de la misma junto con el trabajo anterior serán factores decisivos para continuar y encausar investigaciones fitofarmacológicas posteriores con miras a una posible aplicación terapéutica.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales:

Para la selección farmacológica se partió del extracto etéreo purificado, el cual es una fracción del extracto etéreo total de las flores de *Spilanthes americana*, al cual se le han eliminado las ceras, y ha sido purificado finalmente mediante extracción con nitrometano. La fracción purificada contiene varias alquilamidas insaturadas, entre las cuales se encuentran isobutilamidas acetilénicas. Dada la liposolubilidad del extracto se hizo necesario utilizar un vehículo que permitiera su incorporación para poder ser administrado.

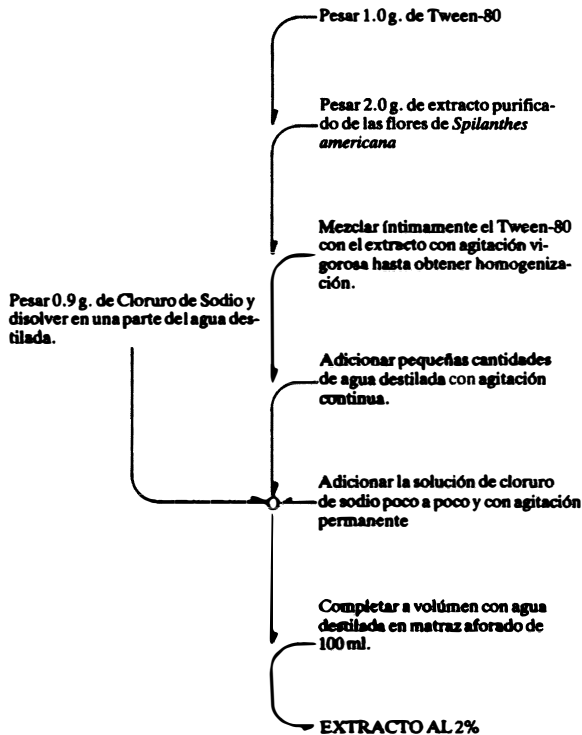
Como reactivo biológico se emplearon Ratones ICR, machos, peso: 20-25 g.; Ratas Fisher-344, hembras, peso: 170-220 g.; Conejos albinos adultos; Sapos adultos y Lombrices de tierra.

* Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Apartado Aéreo 14-490.

Métodos:

Incorporación del extracto en el vehículo. La incorporación del extracto en el vehículo se realizó en la forma descrita en el Diagrama 1.

DIAGRAMA 1
METODO DE INCORPORACION DEL EXTRACTO EN EL VEHICULO



Toxicidad Agua. Determinación de la Dosis Letal 50. La determinación se realizó en ratones, los cuales se distribuyeron en 10 grupos de 10 animales. Se dejaron en ambientación durante una semana, al cabo de la cual se procedió a administrarles el extracto por vía intraperitoneal (IP) previo ayuno de 15 horas. Las dosis empleadas fueron 1, 5, 10, 20, 22.5, 23.5, 25, 40, 55 mg/Kg de peso, en un volumen constante de 0.5 ml; al grupo control se le administró un volumen igual de vehículo.

Los animales fueron observados desde el momento de la administración y por un período de 15 días, registrándose el número de muertes y el comportamiento en general. Posteriormente se sacrificó un animal de cada grupo, por exposición a vapores de éter, y se observaron los órganos internos. Con los datos obtenidos se calculó la DL-50 por el método gráfico y el método matemático de Red & Muench. (3,4).

ESTUDIO FARMACOLOGICO

1. Sistema Nervioso Central.

Toda su evaluación se realizó utilizando Ratas Fisher-344 de las características ya descritas. En todos los casos, el extracto fue administrado a los animales por vía peroral (PO), en una dosis de 150 mg/Kg previo ayuno de 15 horas, y tomando un grupo de animales como control.

1.1. *Perfil Neurofarmacológico.* El extracto se administró a un grupo de 10 ratas (Dosis: 150 mg/Kg vía PO mg/kg); a otro grupo similar se le administró el vehículo (0.5 ml, vía PO), y un tercer grupo fue tomado como control. Se utilizó la metodología y evaluación de acuerdo con el método descrito por Turner (5).

1.2. *Actividad Motriz.* Fue evaluada mediante el actógrafo y la observación del comportamiento general, de manera similar a la descrita por Ponomareva (6), Takagi (7), Turner (5) y Teppert (8).

1.3. *Actividad Convulsivante y Anticonvulsivante.* Se siguió la metodología descrita por Teppert (8), Góngora (9), Ahmad (10) y Ponomareva (6). Se ensayó la capacidad antagonica de cada sustancia anticonvulsivante frente al extracto, evaluando el comportamiento general y el promedio del número de movimientos registrados en el actógrafo. Como fármacos anticonvulsivantes se emplearon Fenobarbital, Difenilhidantoinato sódico, Diazepam y Trimetadiona.

1.4. *Actividad antidepresiva.* El método seguido fue similar al descrito por Teppert (8) y Góngora (9). Se observó el antagonismo o sinergismo del extracto, la Nialamida y el vehículo en ratas previamente tratadas con Reserpina.

1.5. *Actividad Antiparkinsoniana.* Se siguió el método descrito por Barastegui (11) y Teppert (8). Se ensayó la capacidad antagonica de fármacos como la Atropina y la 1-Dopa frente al extracto.

2. Sistema Nervioso Periférico

2.1. *Actividad Curarizante.* Se evaluó en recto abdominal de sapo, de acuerdo con las técnicas descritas por Long & Chiou (12), Barastegui (11) y Góngora (9). Se probó el efecto del extracto sobre esta preparación y su antagonismo con la d- Tubocurarina.

2.2. Actividad Anestésica Local.

2.2.1. Anestesia de Superficie.

2.2.1.1. *Valoración en córnea de conejo:* Se siguió la técnica descrita por Teppert (8), Barastegui (11), y Góngora (9).

2.2.1.2. Valoración en lombriz de tierra: Se siguió el método descrito por Block (13). Se probó la actividad del extracto empleando como patrones Cocaína y Lidocaína.

2.2.2. Anestesia por Infiltración. Valoración en piel de Conejo.

Basándose en los métodos descritos por Barastegui (11), Teppert (8), Góngora (9), y Ozawa (14), se probó la actividad del extracto utilizando como patrón Lidocaína.

3. Sistema Nervioso Autónomo.

3.1. Perfil Neurofarmacológico. La evaluación se hizo en ratas, manteniendo las condiciones de ayuno, dosificación, vía de administración, etc., ya mencionadas. Se realizó según los métodos descritos por Turner (5), Tekagi (7) y Teppert (8).

3.2. Intestino aislado de conejo. Se siguió la técnica descrita por Barastegui (11), Teppert (8), Domer (15) y Long & Chiou (12).

4. Sistema Cardiovascular. Corazón "in situ".

Se evaluó en sapos adultos, siguiendo la metodología descrita por Gpongora (9). Se probó la acción del extracto y su antagonismo o sinergismo frente a fármacos como la Atropina y la Lidocaína.

RESULTADOS Y DISCUSION

Toxicidad Aguda. DL-50. Los datos obtenidos en la determinación de la DL-50, se muestran en la tabla 1.

$$\text{Log DL-50} = \text{Log } d_{inf} + \text{Log } i = \frac{50 - M_i}{M_s - M_i}$$

La dosis letal-50 se calculó por el método matemático de Red & Muench, mediante la fórmula anterior.

TABLA 1

Dosis (mg/Kg)	No. Muertos	No. Vivos	Muertos Acumulados	Vivos Acumulados	% de Mortalidad
30.0	10	0	22	0	100
25.0	8	2	12	2	80
23.5	2	8	4	10	20
22.5	2	8	2	18	20
20.0	0	10	0	28	0
0.0	0	10	-	-	0

(Vehíc.)

donde:

d_{inf} : Dosis inferior al 50% de mortalidad: 23.5 mg/kg.

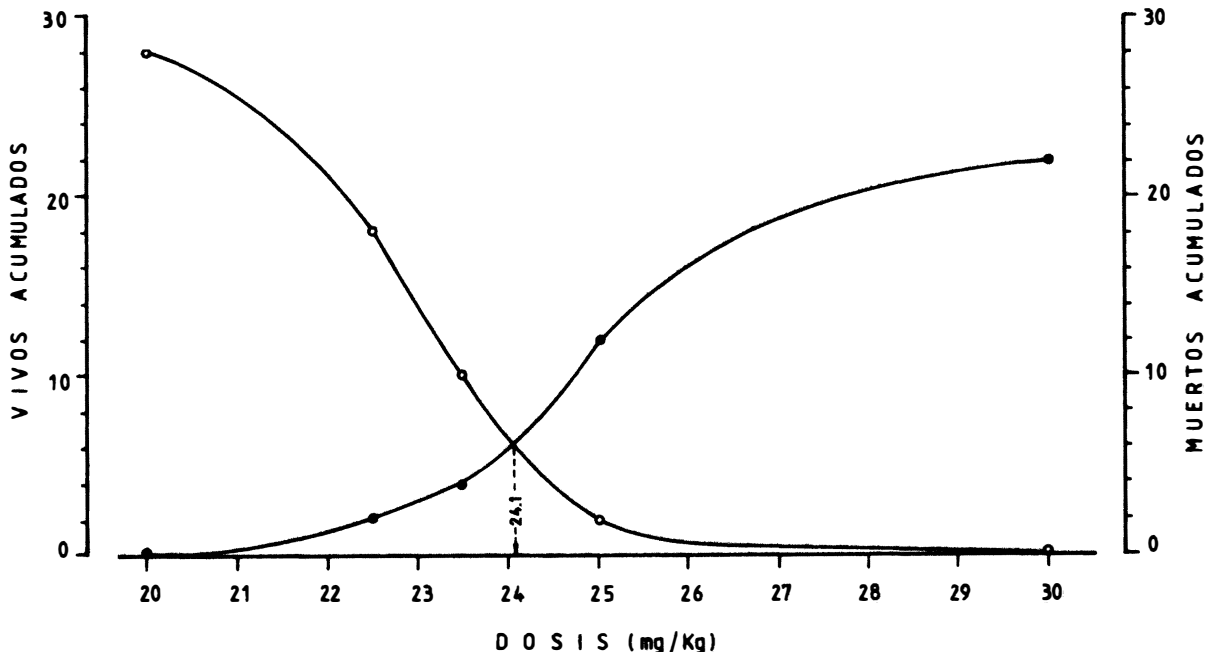
i: Intervalo 25.0/23.5 = 1.064

Mi: Mortalidad inferior al 50%: 20%

Ms: Mortalidad superior al 50%: 80%

FIGURA 1

CURVA EN ESPEJO PARA EL CALCULO DE LA DL-50



por lo tanto la DL-50 calculada por este método es = 24.2 mg/kg, por vía IP en ratones ICR, sexo ó, peso promedio 22.5 g.

También se calculó la DL-50 por el método gráfico de la curva en espejo, (ver figura 1), en la cual el valor encontrado fue de 24.1 mg/kg.

En general, la sintomatología observada fue: inquietud, irritabilidad, temblor, convulsiones tónico-clónicas y finalmente una fuerte convulsión tónica en extensión que precede a la muerte del animal. Los animales que murieron a causa del extracto, presentaron múltiples hemorragias en los pulmones; los demás órganos presentaron un aspecto normal y no se observó necrosis en el sitio de inyección.

Algunos de los animales que se sacrificaron al finalizar la DL- 50 presentaron en el sitio de inyección un pequeño quiste; la mayoría mostró tener una coloración anormal en los pulmones (color café), y muy pocos mostraron inclusiones grasas en el hígado. El grupo de animales a los que se les suministró el vehículo no mostró lesiones en sus órganos.

ESTUDIO FARMACOLOGICO

En todas las evaluaciones se probó, paralelamente con el extracto los fármacos empleados y el vehículo

de administración del extracto. Este no mostró tener ninguna actividad farmacológica en las pruebas realizadas. Todos los ensayos se realizaron siempre a la misma hora.

1. Sistema Nervioso Central.

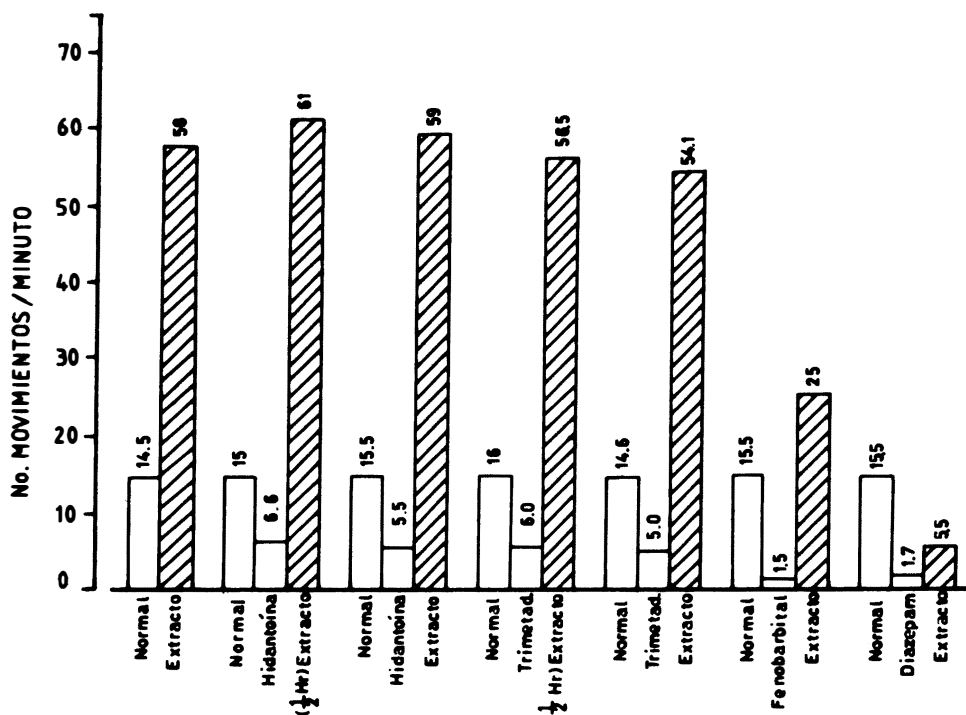
1.1. *Perfil Neurofarmacológico.* Los resultados revelaron una clara acción estimulante del extracto.

1.2. *Actividad Motriz.* El extracto aumentó notoriamente la actividad motriz comparada con la actividad motriz normal. Se observó un antagonismo entre el Fenobarbital y el extracto y un sinergismo entre la cocaína y el extracto. Todos los animales tratados únicamente con extracto murieron, lo mismo que los tratados con cocaína y extracto; en cambio los tratados con fenobarbital y extracto no murieron ni presentaron la sintomatología característica.

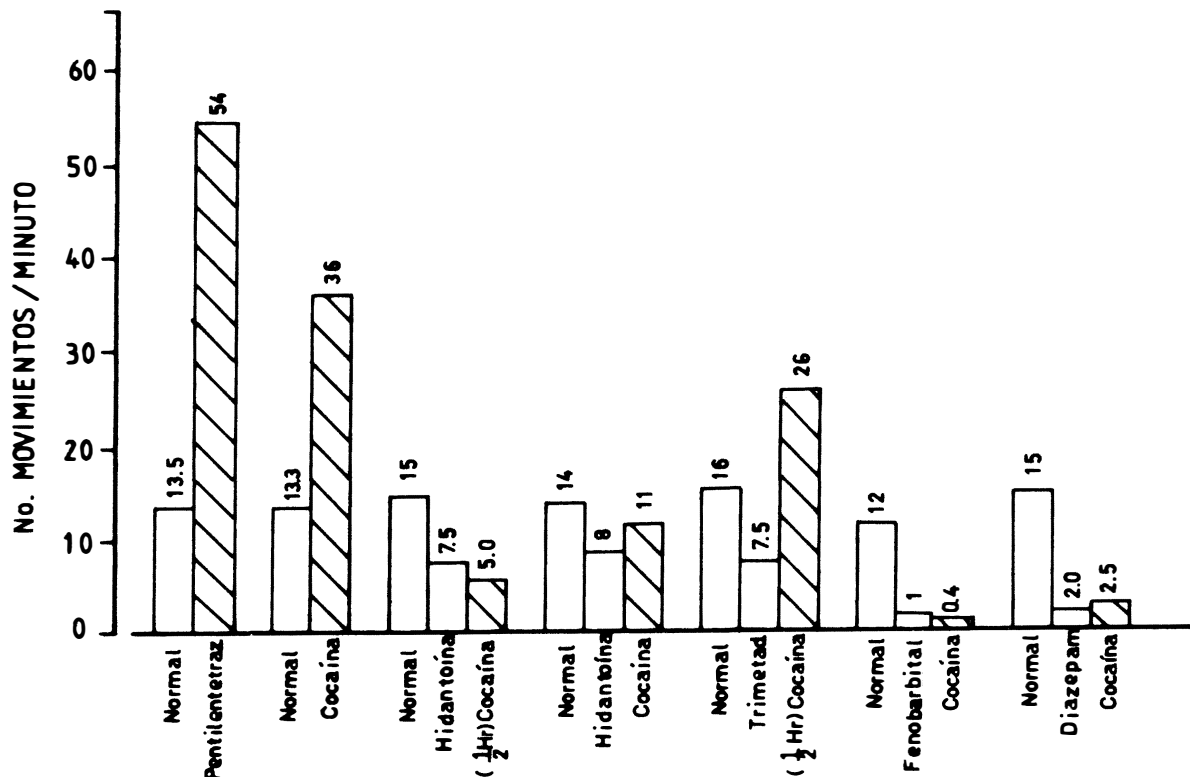
1.3. *Actividad convulsivante y anticonvulsivante.* Se probaron como fármacos anticonvulsivantes los siguientes: Fenobarbital, difenilhidantoína, trimetadiona y diazepam. Con el fenobarbital y el diazepam la protección fue efectiva, siendo mejor con el diazepam, mientras que con la difenilhidantoína sólo se observó en el 50% de los casos, y con la trimetadiona no hubo protección. Figura 2.

FIGURA 2

ACTIVIDAD CONVULSIVANTE Y ANTICONVULSIVANTE
COMPARACION DEL No. MOVIMIENTOS POR MINUTO



(Continuación) **FIGURA 2**



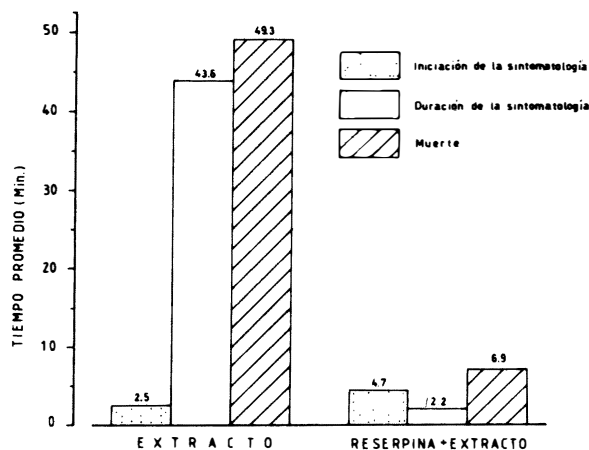
1.4. *Actividad Antidepresiva.* El extracto y la nialamida se administraron una vez desarrollado el estado de catalepsia inducido por la reserpina. El patrón utilizado como antidepresivo (nialamida), causó una reducción significativa del tiempo de duración de la catalepsia respecto al grupo control, lo cual es lógico, puesto que la nialamida al ser un IMAO impide la destrucción total de los neurotransmisores (principalmente dopamina y noradrenalina) que no han sido recaptados por causa del bloqueo adrenérgico neuronal inducido por la reserpina, y de ahí su acción estimulante del SNC. En el grupo de animales tratados con la reserpina el tiempo de duración de la sintomatología y de la muerte producida por el extracto se acorta significativamente con respecto a los tiempos observados para el extracto solo, como puede verse en la figura 3. Esto puede deberse a la acción bloqueante adrenérgica neuronal de la reserpina, que causa depleción de noradrenalina en los tejidos inervados por el SNA-simpático (16) lo cual hace que bajen los niveles de catecolaminas neurotransmisoras. Como el extracto posee una clara actividad colinérgica, como puede verse en los resultados, al estar inhibida la parte simpática o adrenérgica predominará la parasimpática o colinérgica y si en este estado se administra un compuesto de acción colinérgica se potenciará, lógicamente, el efecto de este último. Para esta experiencia también se mantuvieron las condiciones de ayuno, horario de experimentación, y vía de administración del extracto y del vehículo.

1.5. *Actividad Antiparkinsoniana.* Puesto que el extracto en la fase inicial de la sintomatología simula un síndrome de Parkinson experimental, caracterizado

por temblores, se trató de antagonizar este efecto con atropina y l-dopa, las cuales actúan como antiparkinsonianos pero por diferente mecanismo. El extracto se administró luego de 1 hora de haber aplicado l-dopa y atropina a los grupos correspondientes. El 70% de los animales tratados previamente con l-dopa murieron entre los 21 y los 60 minutos, mientras que

FIGURA 3

COMPARACION DE LOS TIEMPOS PROMEDIO DE INICIO, DURACION DE LA SINTOMATOLOGIA Y MUERTE PARA LOS ANIMALES TRATADOS CON RESERPINA-EXTRACTO Y LOS TRATADOS UNICAMENTE CON EXTRACTO



el 91% de los animales tratados con atropina murieron entre los 91 y los 180 minutos. Esto sugiere que la atropia ofrece mayor protección frente al extracto, lo cual corrobora la actividad colinérgica que se observó a través de este estudio. Las figuras 4 y 5 ilustran dicho resultado.

2. Sistema Nervioso Periférico

2.1. *Actividad Curarizante.* El extracto produjo contracción del músculo estriado, la cual fue más intensa que la producida por la acetilcolina a concentraciones semejantes. la contracción que causa el extracto va acompañada de fasciculaciones, las cuales permanecen aún después de hacer varios lavados y de que el músculo ha recobrado su tono normal. La d-Tubocurarina inhibe completamente las fasciculaciones y la contracción producida por el extracto, lo cual puede deberse a una actividad colinérgica a nivel del receptor nicotínico dado el antagonismo tan evidente que se observa, quedando descartada una actividad musculotrópica, ya que el músculo curarizado aunque no responde a la acetilcolina ni al extracto, si responde al cloruro de potasio. Figura 6 y 7.

2.2. Actividad Anestésica Local.

2.2.1. *Anestesia de Superficie.* No pudo evaluarse en córnea de conejo debido a la irritación que produce el extracto, la cual no es debida al pH ni al vehículo sino probablemente a los componentes presentes en el extracto. En la evaluación en lombrices de tierra, el extracto al igual que los patrones produjo anestesia de superficie; sin embargo no se pudo determinar el tiempo de duración de ésta ya que los animales murieron antes de recobrar la sensibilidad, observándose que la muerte se produjo más rápido en los animales tratados con extracto. Figura 8.

2.2.2. *Anestesia por infiltración.* El extracto mostró una actividad anestésica en piel de conejo mayor que la del patrón empleado (Lidocaína). Esto puede deberse a la presencia de varios compuestos, que pueden potenciar esta acción; a una vasoconstricción por irritación lo cual causaría mayor permanencia del extracto en el sitio de acción, o a alteraciones en las terminaciones nerviosas sensitivas. Figura 9.

3. Sistema Nervioso Autónomo.

3.1. *Perfil Neurofarmacológico.* Los datos mostraron una actividad colinérgica o parasimpaticomimética en los animales tratados con el extracto.

3.2. *Intestino aislado de conejo.* El extracto produjo contracción del intestino aislado, aunque de menor magnitud que la inducida con acetilcolina. La contracción fue inhibida por la Atropina. Se evidenció que el extracto posee actividad colinérgica a nivel del receptor muscarínico, y queda descartado que ésta se deba a un efecto irritante o musculotrópico, pues el músculo atropinizado sí respondió al tratamiento con cloruro de bario. Figura 10 y 11.

4. Sistema Cardiovascular.

Corazón "in situ". El tratamiento con extracto produjo una arritmia de tipo bradicardizante, lo cual concuerda con los resultados obtenidos a lo largo de la selección farmacológica, que evidencia una acción colinérgica. Este efecto bradicardizante se mantiene aún después de la administración de Lidocaína, pero no se observa bradicardia en el músculo cardíaco tratado previamente con Atropina; esto comprueba su efecto colinérgico y descarta una posible acción irritante. Figuras 12, 13 y 14.

FIGURA 4

COMPARACION DEL TIEMPO DE RESPUESTA (MORTALIDAD) PARA LOS ANIMALES PROTEGIDOS CON L-DOPA FRENTE AL EXTRACTO

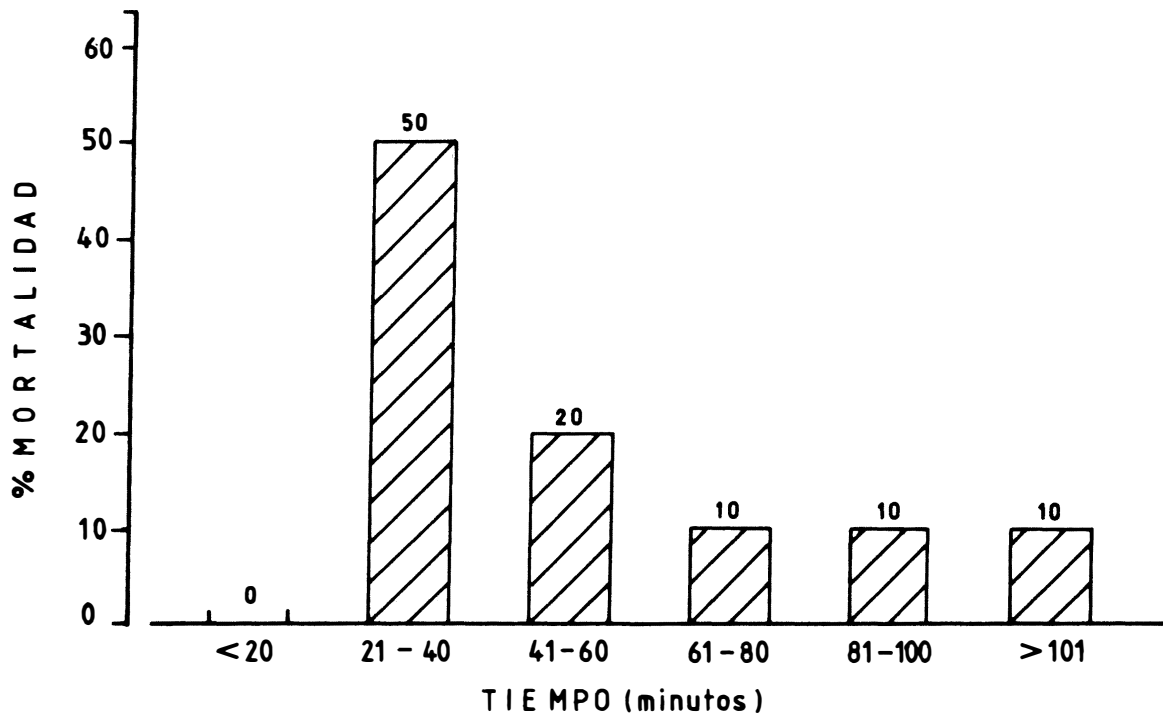


FIGURA 5

COMPARACION DE LOS TIEMPOS DE RESPUESTA (MORTALIDAD) PARA LOS ANIMALES PROTEGIDOS CON ATROPINA FRENTE AL EXTRACTO

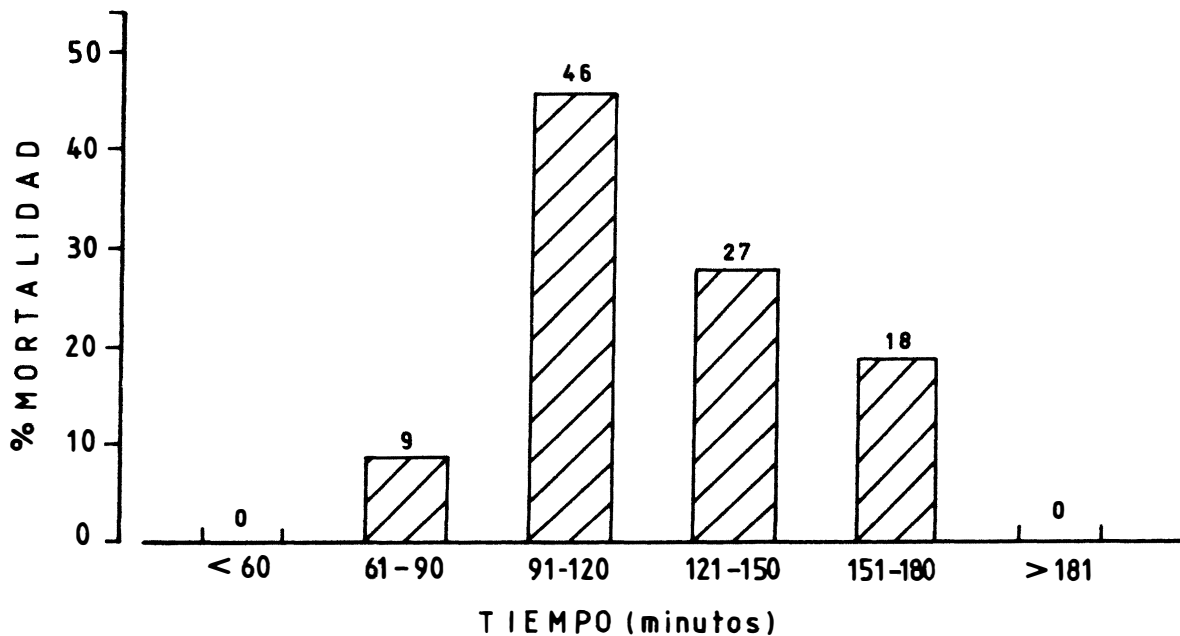
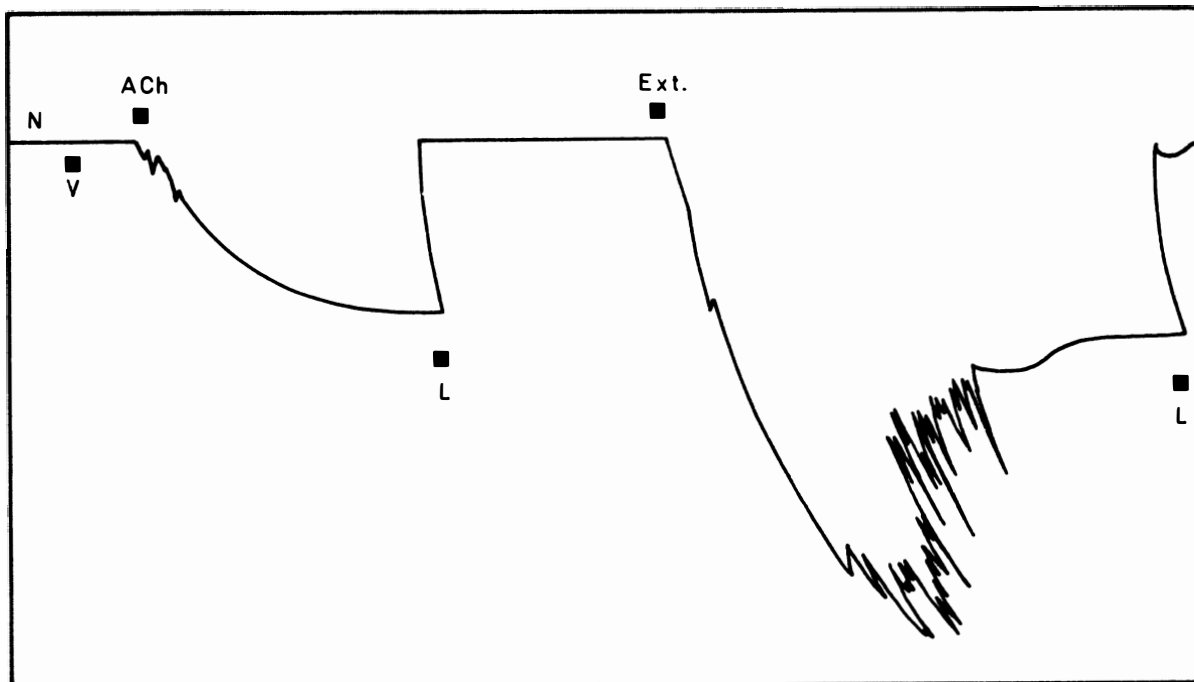
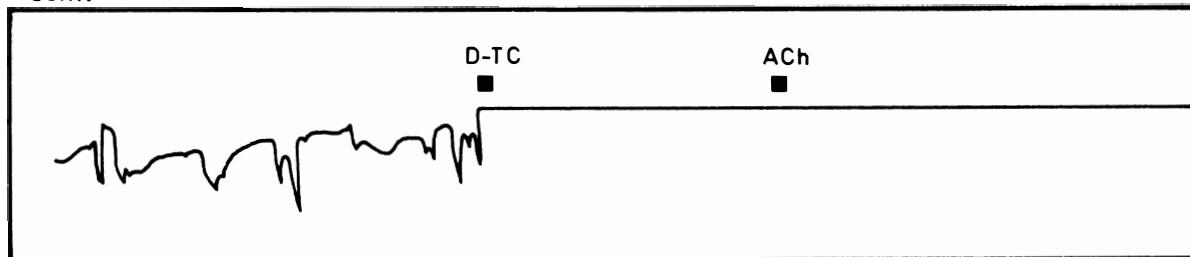


FIGURA 6

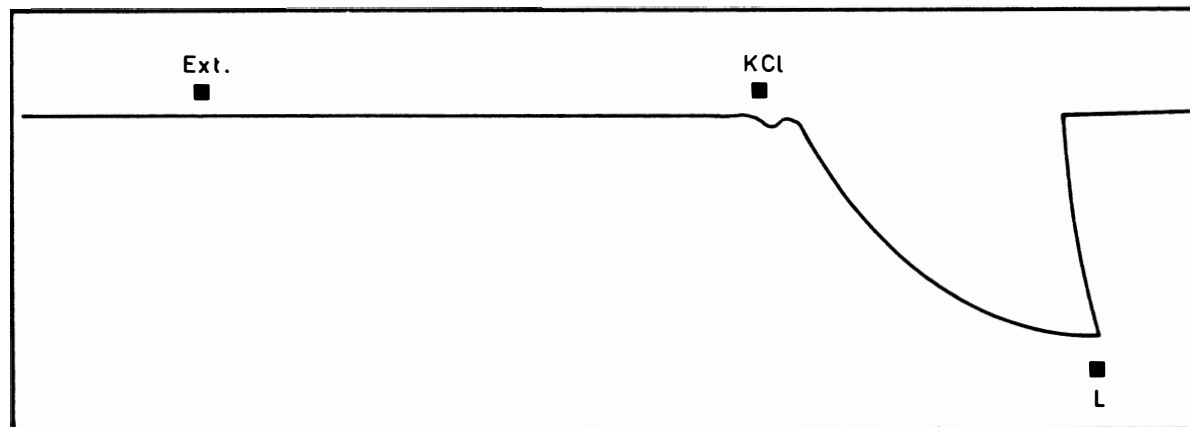
MUSCULO RECTO ABDOMINAL DE SAPO. ACCION DEL EXTRACTO



cont.



cont.



■ N = Registro Normal
L = Lavados
V = Vehiculo

ACh = Acetil-colina
Ext. = Extracto

D-TC = D-Tubocurarina
KCl = Cloruro de Potasio

FIGURA 7

COMPARACION DEL PORCENTAJE PROMEDIO DE CONTRACCION DEL MUSCULO RECTO ABDOMINAL DE SAPO POR LA ACCION DE LA ACETILCOLINA, EXTRACTO Y NICOTINA

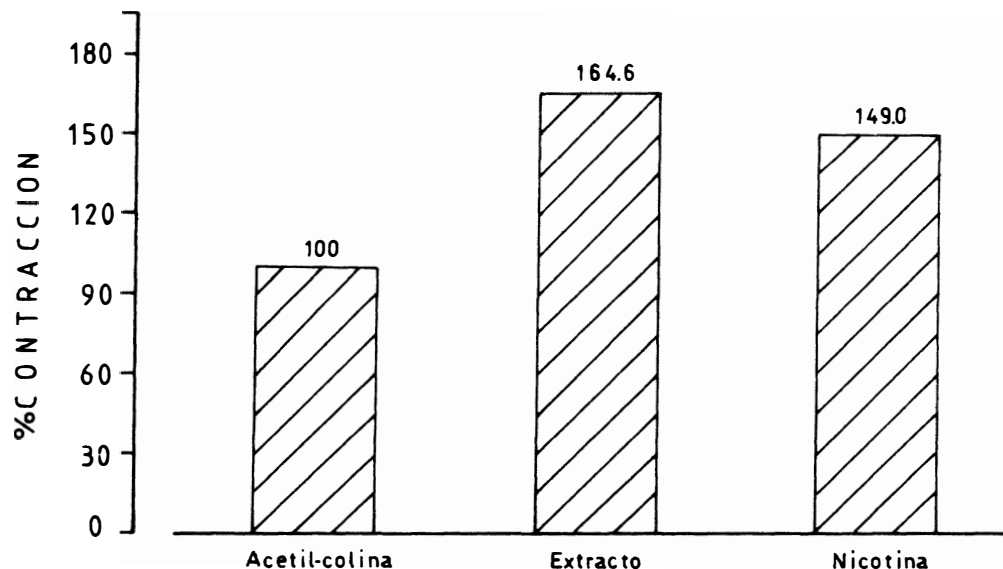


FIGURA 8

COMPARACION DE LOS TIEMPOS PROMEDIO DE VIDA DE LAS LOMBRICES DE TIERRA TRATADAS CON EXTRACTO, VEHICULO Y PATRONES DE ANESTESICOS LOCALES

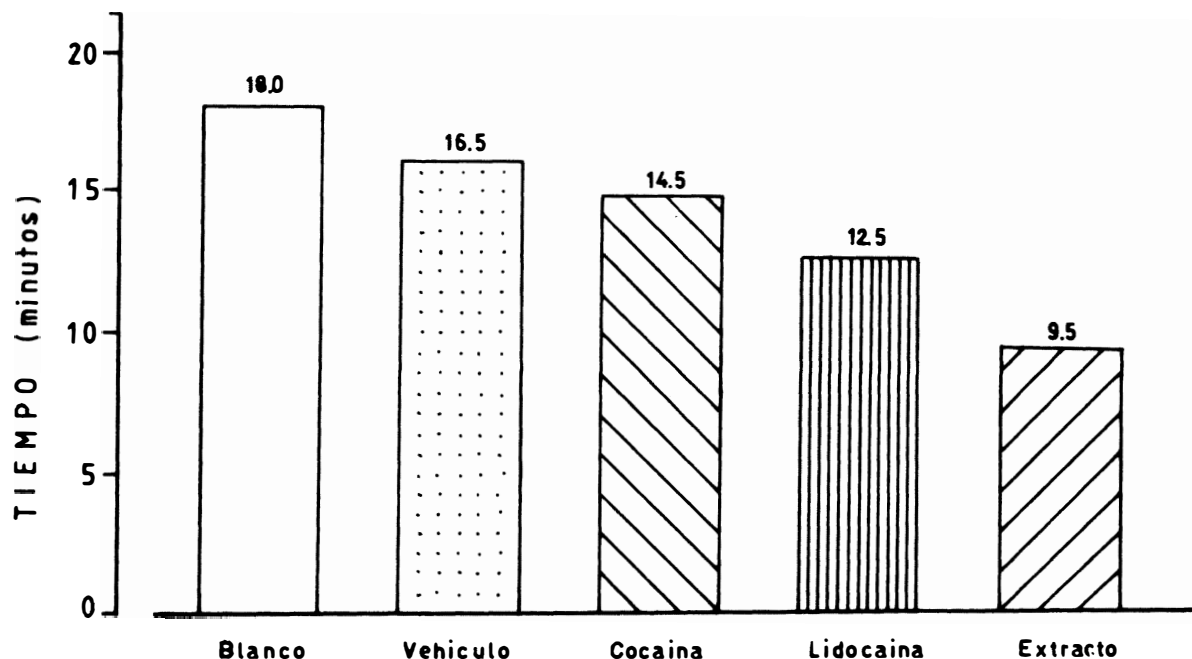
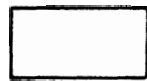
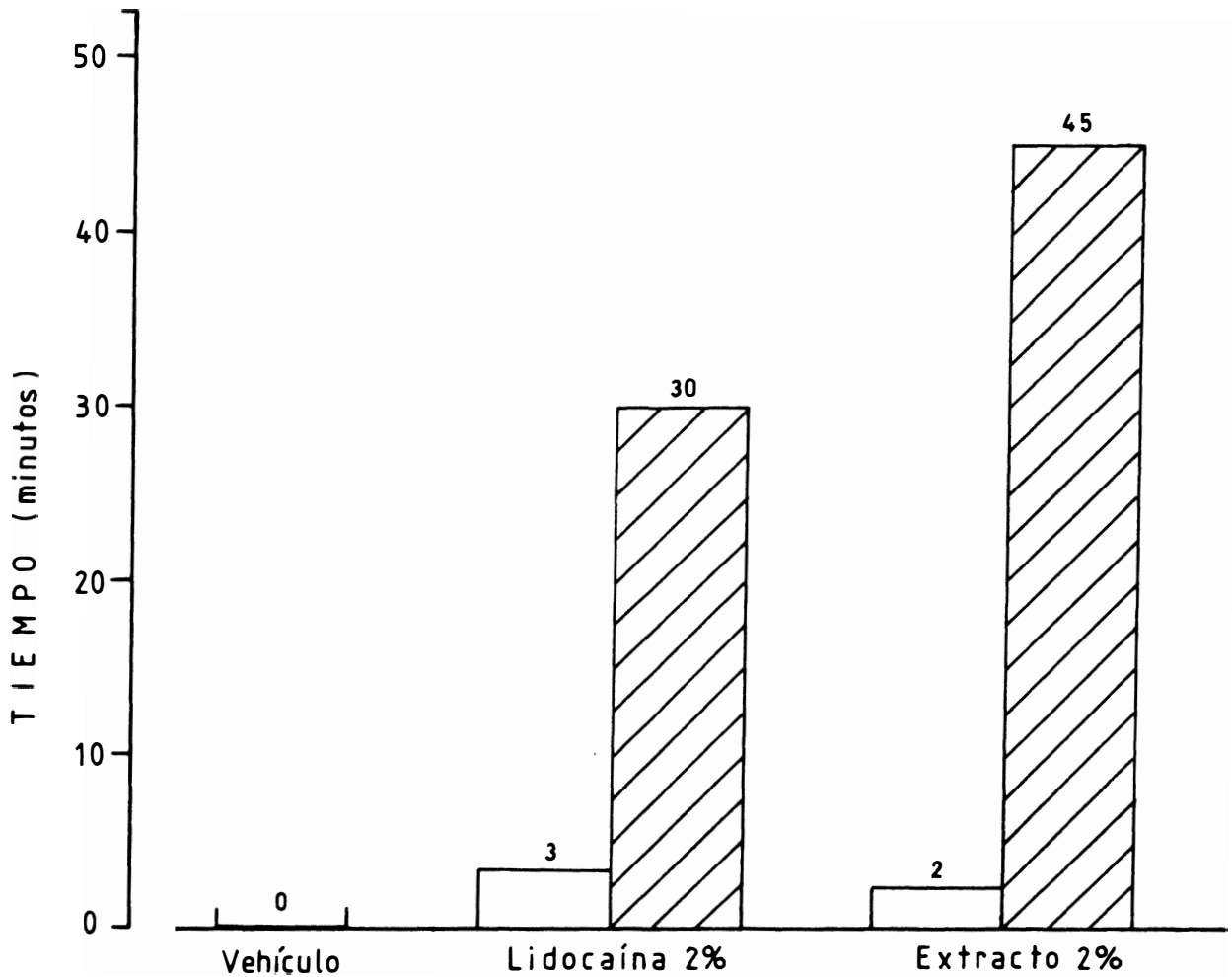


FIGURA 9

COMPARACION DE LOS TIEMPOS DE LATENCIA Y DE LA ACTIVIDAD ANESTESICA DEL EXTRACTO Y DE LA LIDOCAINA EN PIEL DE CONEJO



Tiempo de latencia



Tiempo de duración de la anestesia

FIGURA 10

INTESTINO AISLADO DE CONEJO. EFECTO DEL EXTRACTO

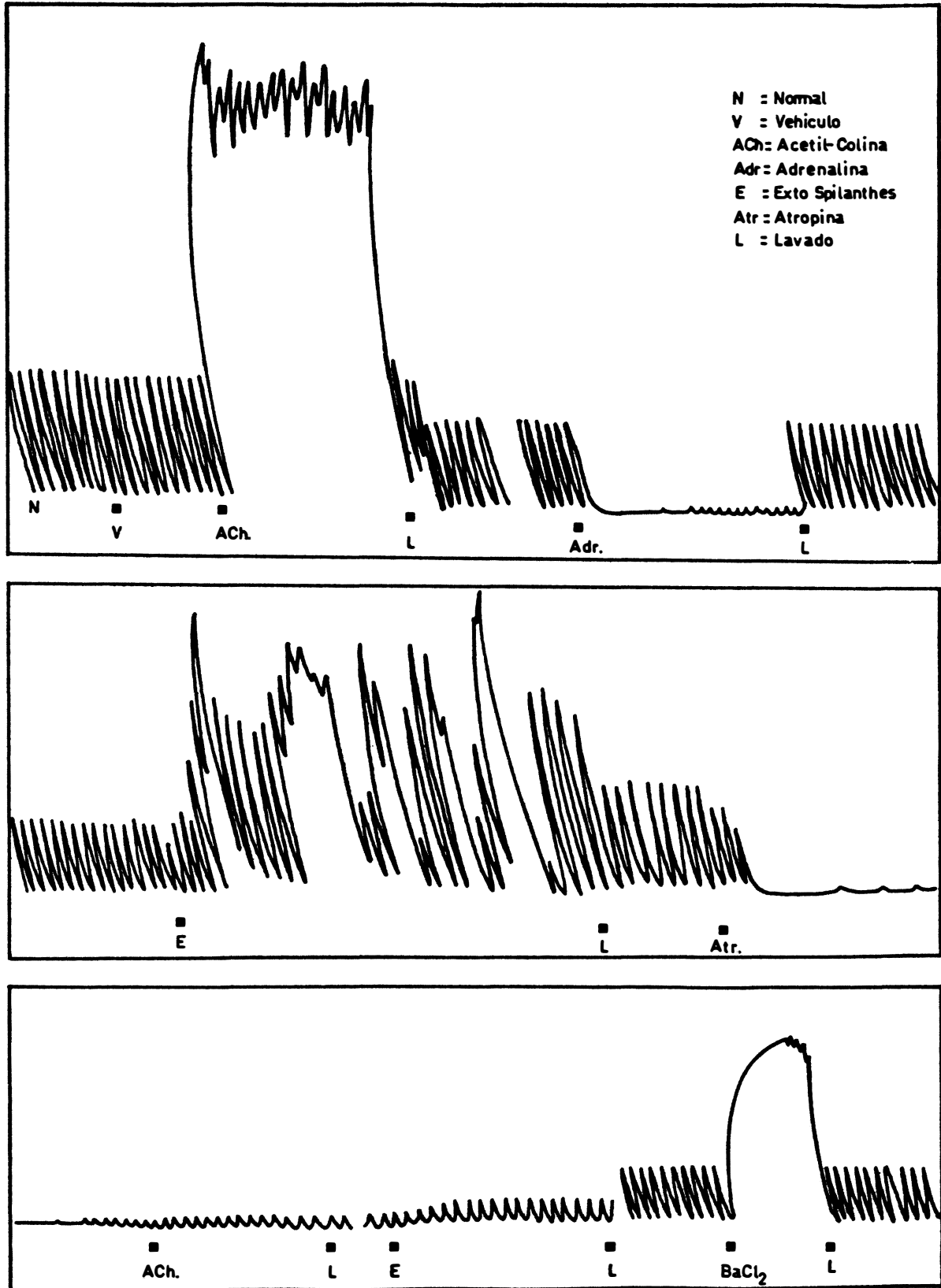


FIGURA 11

INTESTINO AISLADO DE CONEJO COMPARACION DE LOS PORCENTAJES DE CONTRACCION DEL EXTRACTO Y DE LA ACETIL-COLINA

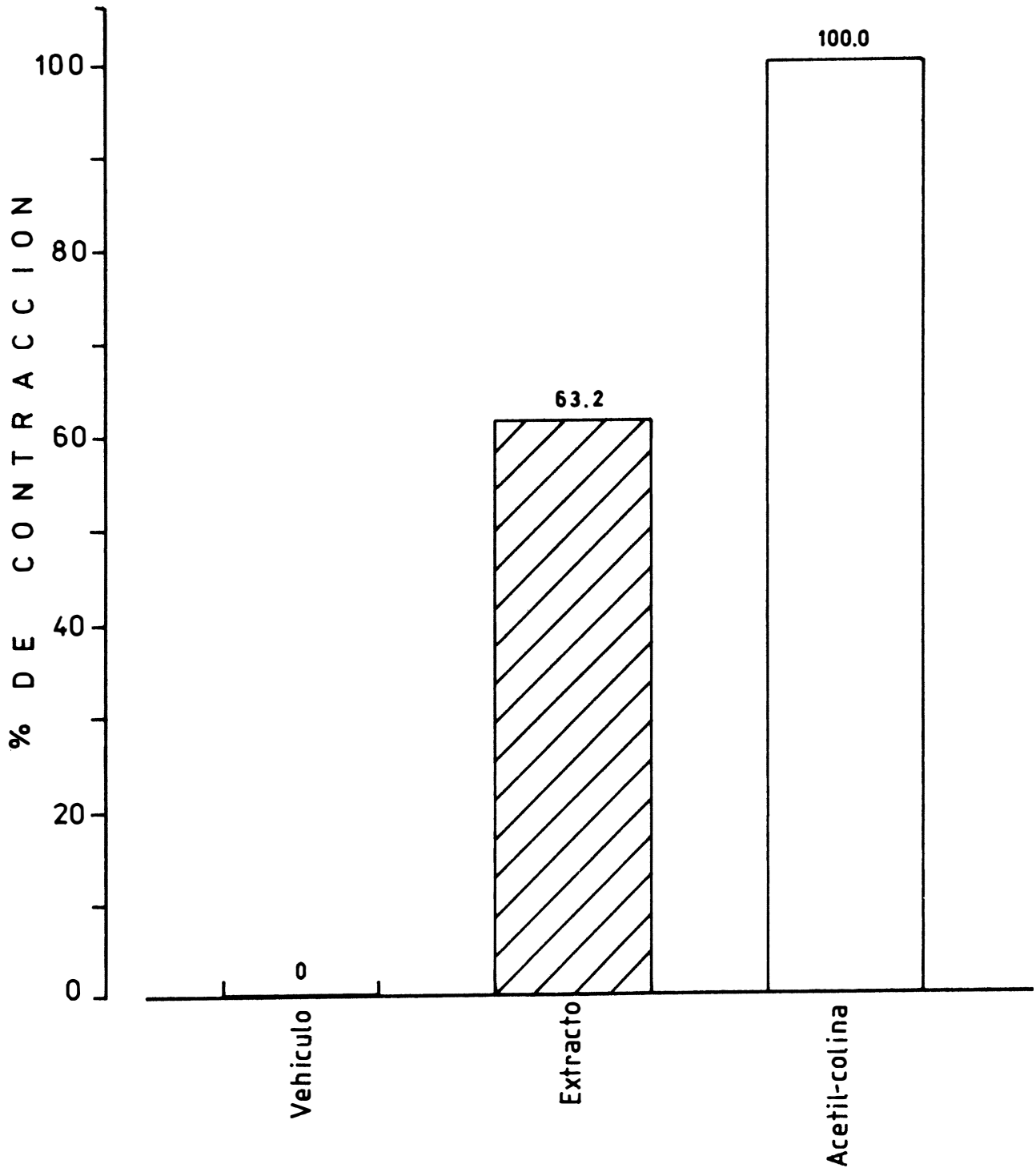
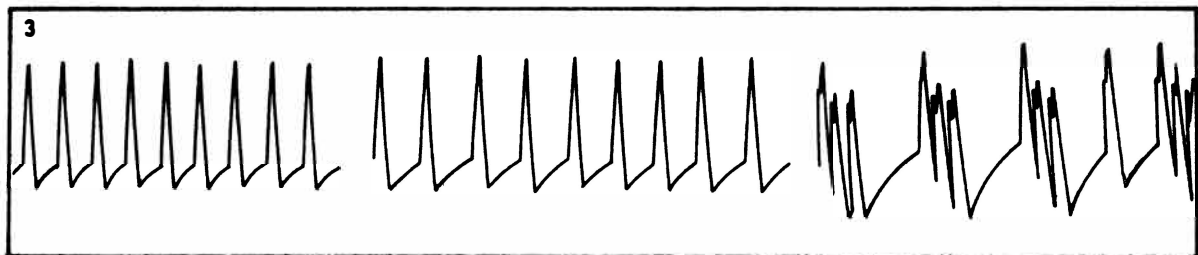
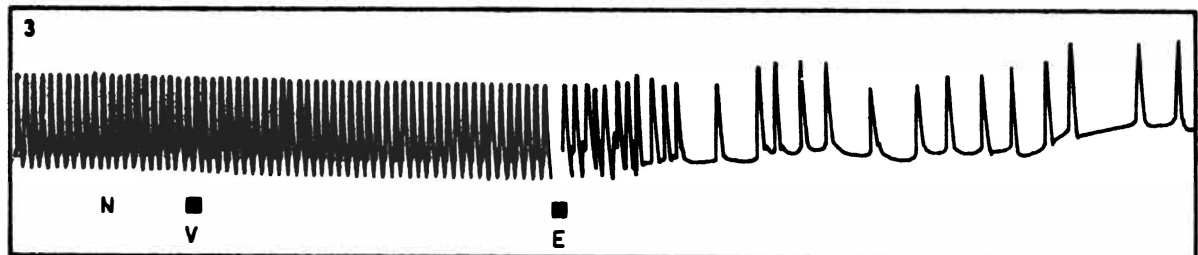
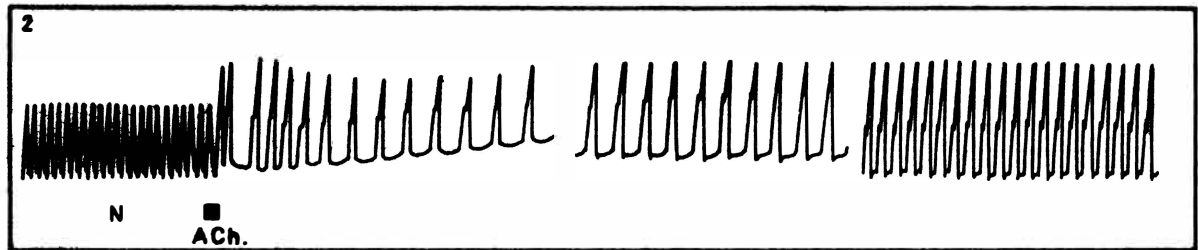


FIGURA 12

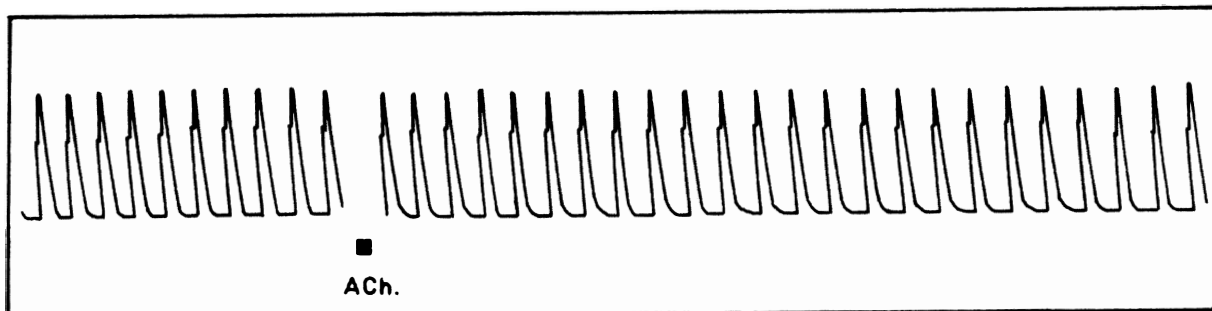
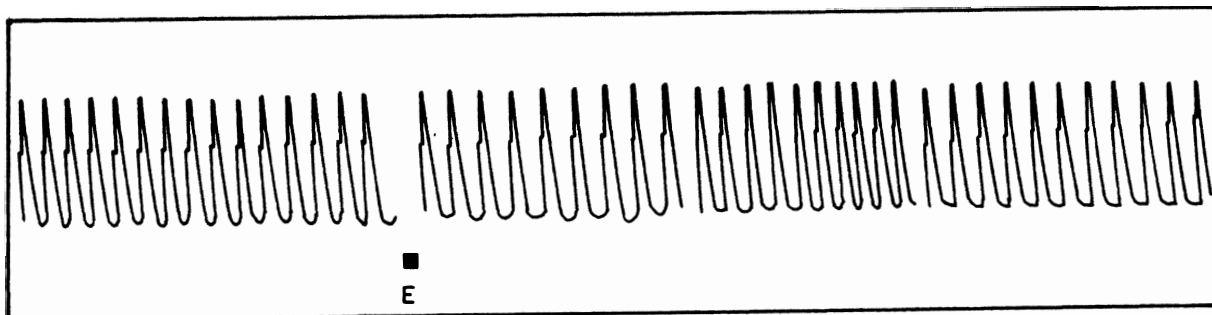
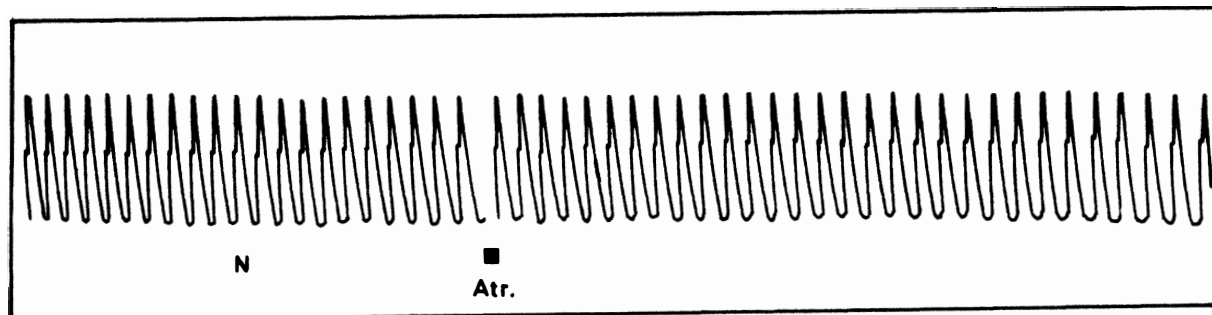
CORAZON "IN SITU": ACCION DE LA ADRENALINA, LA ACETIL-COLINA Y EL EXTRACTO



■
N = Normal
Adr. = Adrenalina
ACh. = Acetil-colina
V = Vehículo
E. = Extracto

FIGURA 13

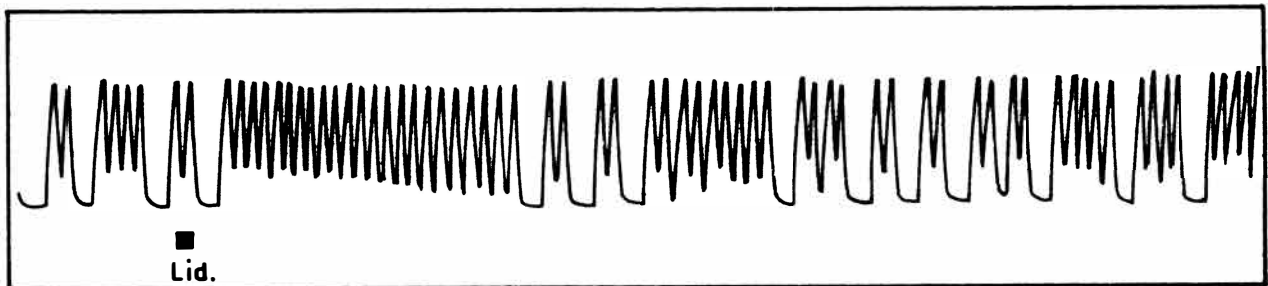
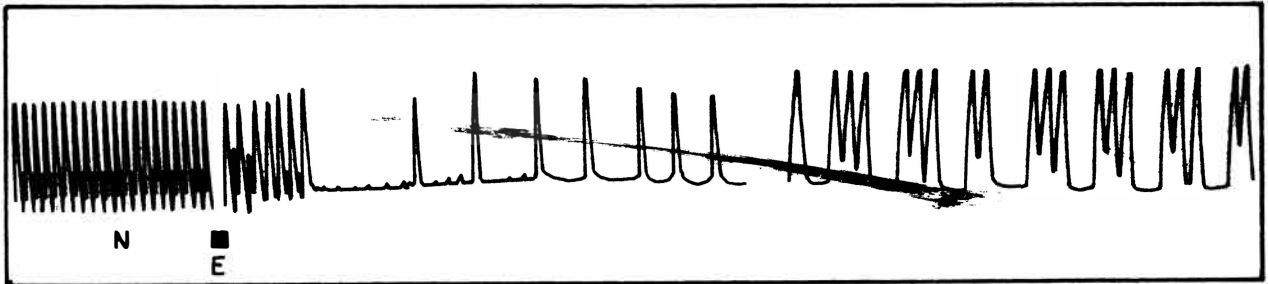
CORAZON "IN SITU": ANTAGONISMO ATROPINA-EXTRACTO



■
N = Normal
Atr. = Atropina
E = Extracto
ACh = Acetil-colina

FIGURA 14

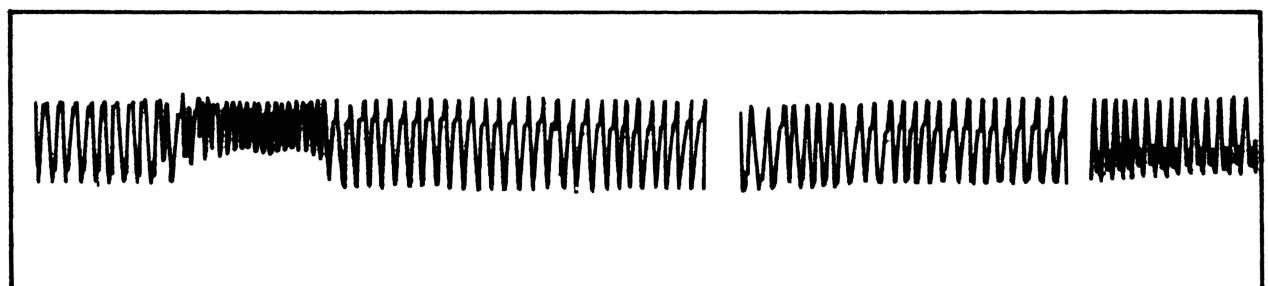
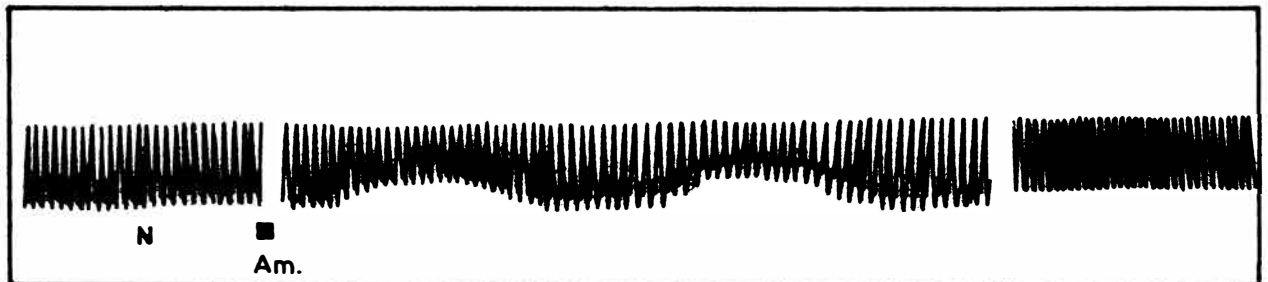
CORAZON "IN SITU": APLICACION DE EXTRACTO Y LIDOCAINA



■ : N = Normal E = Extracto Lid. = Lidocaina

FIGURA 15

CORAZON "IN SITU": APLICACION DE LA AMIDA AISLADA



■ : N = Normal Am. = N-isobutilamida

BIBLIOGRAFIA

1. GIRALDEZ, A. "Extrategias en la investigación de nuevos fármacos". Conferencia dictada en el Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Noviembre 27 de 1984.
2. CALLE, M. & PRADA, J. "Efectos antiherpes y antiaftas de la *Spilanthes americana* (Chisacá)", Revista de la Federación Odontológica Colombiana, XXIV, (120): 3, 1977.
3. OSPINA DE NIGRINIS, L.S. "Contribución al estudio fitofarmacológico de la *Spilanthes americana* (Mutis)", Tesis de Magister en Farmacología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá, 1980.
4. HERRERA, A. & KECAN, G. "Análisis Fitoquímico y Farmacológico del *Solanum marginatum*", Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 1, (3): 41, 1970.
5. TURNER, R.A. "Screening Methods in Pharmacology". Academic Press, New York, U.S.A. 1965.
6. PONOMAREVA, A.G. "Effect of Aziprin on the Central Nervous System". Russian Pharmacol and Toxicol. 32, (1): 181, 1969.
7. TAKAGI, K.; SAITO, H. & NABATA, H. "Pharmacological studies of *Panax ginsengroot*: estimation of pharmacological actions". The Japanese J. Of Pharmacol., 22, (2): 245, 1972.
8. TEPERT, W.A. "A laboratory manual for pharmacology". 3rd. ed., Drake University College of Pharmacy, Des Moines, Iowa, U.S. a., 1967.
9. MENESES DE GONGORA, B.; MRAD DE OSORIO, A.; POLO, A. & HERNANDEZ, L. "Manual de Prácticas de Farmacología Especial", Publicaciones Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá, 1968.
10. AHMAD, A. & DHAWAN, B.N. "Metrazol test for rapid screening of anticonvulsants". The Japanese J. Of Pharmacol., 19: 472, 1969.
11. BARASTEGUI, C. "Esquema y Prácticas de Farmacología". 1a. Ed., Ed. Espaxs, Barcelona, España, 1976.
12. LONG, J.P. & CHIOU, C.Y. "Pharmacological testing methods for drugs acting on the peripheral nervous system". J. Of Pharm, Sciences, 59, (2): 133, 1970.
13. BLOCK, B.P.; POTTS, D.J. & FINNEY, R. "A simple method for the evaluation of local anaesthetic activity using carthworms". J. Pharmacy and Pharmacol, 16, Suppl., 85T, 1964.
14. OSAWA, H. & SUGAWARA, K. "Cocaine-like actions of hexylguanidine" The Japanese J. of Pharmacol., 19, (3): 343, 1969.
15. DOMER, F.R. "Animal Experiments in Pharmacological Analysis". Charles C. Thomas - Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., 1971.
16. GOODMAN, L. & GILMAN, A. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". Editorial Médica Panamericana, 7a. ed., Buenos Aires, Argentina 1986.