

COMPOSICION QUIMICA Y ACTIVIDAD ABORTIVA DE LAS HOJAS DE ALNUS ACUMINATA

Ahmed M. Salama*
Manuel I. Gallego**
Consuelo Barrera***
Elizabeth Espinal B.***

RESUMEN

El análisis fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas de *Alnus acuminata* mostró la presencia de esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos. Tanto las hojas y sus extractos alcohólico y acuoso mostraron un efecto abortivo alto en cobayas.

SUMMARY

Phytochemical analysis of the alcoholic extract of *Alnus acuminata* leaves showed the presence of sterols, triterpenes, flavonoids, tannins and phenolic compounds. The leaves and their aqueous and alcoholic extracts have a high abortive effect in guinea pig.

13 autopista Medellín, Colombia a 2.600 metros sobre el nivel del mar y 13°C, en julio de 1985. Un ejemplar se encuentra archivado en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número Col. 264848.

Análisis fitoquímico

El análisis fue realizado según el método adoptado en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia (15), con algunas modificaciones. Además se realizó en duplicado cromatografía en capa delgada (Ciclohexano-acetato de etilo, (80:20) revelando las placas con vainillina-ácido orto-fosfórico y ferricianuro de potasio - cloruro férrico, de los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas.

Determinación de Nitratos

El contenido de nitratos en las hojas frescas y secas fue determinado separadamente por el método de Kjeldahl (16).

ESTUDIO FARMACOLOGICO

Material Biológico

Se utilizaron para el desarrollo del trabajo cobayas de aproximadamente 4 semanas de preñez con pesos que oscilaron entre 500 y 700 gr. al inicio del período de experimentación. El período de gestación de estos animales es de 66 a 72 días. Para obtener un buen producto de cruzamiento de los animales, se sexaron y repartieron en grupos con el objeto de eliminar problemas de consanguinidad. A partir de 5 machos y 25 hembras, se conformaron 5 grupos de 5 hembras cada uno, las que se aparean con un macho diferente debidamente identificado y marcado. Así las del grupo No. 01 se aparean con el macho No. 2 y da el nuevo grupo No. 3. Las del grupo No. 2 se aparean con el macho No. 3 y da el nuevo grupo No. 4; las del grupo No. 3 se aparean con el macho No. 4 y da el nuevo grupo No. 5, etc.

Los animales se mantuvieron alojados en una bio-terio, en cajas plásticas con cama de viruta de made-

INTRODUCCION

Varias especies del género *Alnus* mostraron actividad antimicrobiana (1-3), antiinflamatoria (4), espasmolítica (5) y antitumoral (6). Los estudios químicos demostraron la presencia de esteroides, triterpenos (7,8,9), taninos (10,11) y flavonoides (12,13). Los pocos estudios de *A. acuminata* muestran el aislamiento e identificación de dos fenoles del extracto en hidróxido de Sodio de los nódulos radiculares. Los compuestos aislados presentaron gran actividad contra los hongos *Phythium* sp. y *Fusarium oxysporum* (14).

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal

Las hojas de la planta se recolectaron en la finca Manantial de la Sabana de Bogotá, situada en el km

* Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.

** Médico Veterinario, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Bogotá, Colombia.

*** Estudiantes de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia.

ra, a una temperatura de ambiente de 18 a 21°C y una humedad relativa de 45 a 55%. En cada caja fueron colocados un número máximo de 5 animales por facilidades tanto de alojamiento, como de suministro de alimentos, manipulación y control en los datos finales. La alimentación básica de los animales consistió en el suministro de zanahoria, pasto y concentrado para cobayos.

Determinación del efecto abortivo

Hojas frescas y secas

Una población total de 90 animales se dividieron en 3 grupos cada uno de treinta animales. Al primer grupo se le suministró además de la alimentación normal, hojas frescas de *A. acuminata* en cantidad aproximada de 40 g diarios, por cada cobaya. De igual manera se alimentaron las cobayas del segundo grupo pero utilizando hojas secas a cambio de las hojas frescas con la misma cantidad y periodicidad cíclica en el suministro del alimento. Al tercer grupo le fue suministrada solamente la alimentación normal, por tratarse del grupo de animales control. Las hojas fueron suministradas durante 45 días desde el día 28 de la preñez de las cobayas período durante el cual se habían determinado los posibles abortos por un lado y los nacimientos de las crías de los animales que sostuvieron una preñez normal. Durante todo el tiempo de experimentación, a los animales se les aplicaron los controles de peso y palpaciones. Los resultados se encuentran en la tabla No. 1. Después del tiempo total de la experimentación (45 días) los animales fueron sacrificados y sus órganos más afectados (hígado, útero y riñones) fueron sometidos a un estudio histopatológico.

Determinación de la concentración mínima abortiva de los extractos alcohólico y acuoso

Para garantizar el suministro total diario durante 45 días desde el día 28 de la preñez de las cobayas de cada uno de los extractos se utilizó la vía oral, por medio de una sonda con un diámetro adecuado para evitarle posibles molestias al animal, la cual iba conectada a una jeringa que media el volumen del extracto ya disuelto. El extracto acuoso fue suministrado en forma de solución acuosa, mientras que el extracto etanólico fue suministrado en una mezcla sin riesgos tóxicos de Tween 20: propilenglicol: agua (1:6.5: 2.5).

Se tomaron 10 grupos de 2 cobayos cada uno, con peso entre 450 y 700 gm. Cinco grupos para el extracto acuoso, 5 grupos para el extracto alcohólico obtenidos de las hojas secas de *A. acuminata*, considerando un grupo en cada caso como control que recibe únicamente el solvente en el cual fue suministrado el extracto para los otros grupos. Los extractos fueron administrados a los correspondientes grupos de animales en concentraciones de 120, 80, 40 y 20 mg en un volumen de 2 ml de solvente, diariamente por 45 días

desde el día 28 de la preñez de las cobayas. De las concentraciones utilizadas en cada uno de los extractos se seleccionó la concentración que involucrará la menor cantidad de extracto suministrado y que a la vez presentará mayor porcentaje de abortos. Con el fin de unificar la concentración fue seleccionada la de 80 mg para ambos extractos. Los resultados se muestran en la tabla No. 2.

Efecto abortivo del extracto acuoso

La actividad abortiva fue evaluada suministrando el extracto por vía oral como se mencionó anteriormente a 6 grupos de 5 animales cada uno, en una concentración de 80 mg en 2 ml de agua diariamente por 45 días desde el día 28 de la preñez. Como animales de control se tomaron otros 6 grupos de 5 animales cada uno, que solo se les administró 2 ml de agua diariamente durante el mismo período de tratamiento. Todos los grupos de animales fueron alimentados y controlados bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la tabla No. 1.

Efecto abortivo del extracto alcohólico

Igualmente la actividad abortiva fue evaluada suministrando el extracto por vía oral a 6 grupos de 5 cobayas, en concentración de 80 mg en 2 ml de una mezcla de Tween 20-propilenglicol-agua (1:6.5:2.5). 6 grupos de 5 cobayas cada uno fueron utilizados como control a los cuales se les administraron únicamente 2 ml de la anterior mezcla de solventes. Todos los animales se mantuvieron bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la tabla No. 1.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis fitoquímico

Debido a que los ensayos farmacológicos mostraron un efecto abortivo para las hojas y los extractos de *A. acuminata*, se procedió a estudiar la composición química de las hojas de la planta. Los resultados mostraron la presencia de esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos.

Los esteroides y triterpenos fueron identificados mediante la reacción de Liebermann-Burchard y cromatografía en capa delgada. Los resultados están en acuerdo con los estudios hechos a diferentes especies del género *Alnus* (7,8,9), en los cuales fueron aislados diferentes compuestos terpenicos. Así mismo fueron detectados y aislados varios flavonoides (12,13,17), taninos y compuestos fenólicos (10,11) de varias especies del género *Alnus*.

La determinación de nitratos mostró un contenido de 2000 ppm en peso seco y 2.800 ppm en peso húmedo.

Estudio Farmacológico

Actividad Abortiva

Para determinar si la planta tiene un efecto abortivo, se decidió estudiar las hojas, las cuales representan la mayor parte de la vegetación con la cual se alimenta el ganado.

Hojas frescas y secas

Para confirmar la actividad abortiva que fueron revelados por los ensayos preliminares, se escogieron 3 grupos de 30 animales cada uno para las hojas frescas, secas y control, bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Los resultados (tabla No.1) mostraron un efecto abortivo de 90% para las hojas frescas, 80% para las hojas secas y no mostraron ningún efecto para los controles.

La diferencia de actividad abortiva entre hojas frescas y secas, se puede atribuir a que hay mayor preferencia alimenticia de las hojas frescas por parte de los animales y a que las hojas secas son muy quebradizas, se fragmentan y se pierden dentro de la viruta de madera que es utilizada como cama, por lo tanto hay un menor consumo de las hojas secas y sus constituyentes químicos que causan el efecto abortivo.

TABLA 1

EFFECTO ABORTIVO DE LAS HOJAS Y EXTRACTOS DE *A. acuminata*

Sustancias	Número animales	Número aborto	% Aborto
Hojas frescas	30	27	90
Hojas secas	30	24	80
Controles	30	0	0
Extracto acuoso	30	18	60
Control	30	0	0
Extracto alcohólico	30	22	73
Control	30	0	0

Extracto Acuoso y Etanólico de Hojas Secas.

Después de que la alimentación de las cobayas demostró un efecto abortivo claro, se decidió a determinarlo para los extractos acuoso y alcohólico. Con base en los resultados obtenidos de la comparación por cromatografía en capa delgada entre los extractos acuosos y etanólicos de las hojas frescas y secas, que mostraron tener la misma composición química, se determinó a obtener los extractos de las hojas secas para mayor facilidad. A lograr un suministro razonable de los extractos se procedió a determinar la concentración mínima abortiva de los extractos. De acuerdo a los resultados (Tabla No. 2) se tomó como concentración mínima abortiva la de 80 mg para ambos extractos puesto que fue la menor concentración

que produjo aborto del 100% en ambos casos y ya que además de tener un parámetro de comparación con ambos extractos es necesario utilizar igual concentración en la experimentación.

TABLA 2

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA ABORTIVA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ALCOHOLICO DE LAS HOJAS SECAS

Extractos	Conc. mg/2 ml	Número animales	Número Aborto	% Aborto
Etanólico	120	2	2	100
Acuoso	120	2	2	100
Etanólico	80	2	2	100
Acuoso	80	2	2	100
Etanólico	40	2	2	100
Acuoso	40	2	1	50
Etanólico	20	2	1	50
Acuoso	20	2	0	0
Control	0	2	0	0
Control	0	2	0	0

Habiendo determinado la concentración mínima abortiva, los extractos acuoso y etanólico y sus correspondientes solventes (Control) fueron administrados a las cobayas. Los resultados (Tabla No. 1) mostraron un efecto abortivo del 60% para el extracto acuoso, 73% para el extracto etanólico y ningún efecto para los controles.

El mayor porcentaje de abortos presentado por el extracto etanólico se debe posiblemente a que el alcohol por ser un buen solvente para la mayoría de los componentes de la planta causa mayor extracción de los sustituyentes, lo cual había sido observado en la cromatografía en capa delgada de los extractos acuoso y alcohólico.

Es de anotar que se observó en otros grupos de animales que recibieron los extractos en un estado de preñez avanzada, un pequeño porcentaje de abortos al compararse con el mayor efecto en los que los recibieron en los primeros días de preñez. Sin embargo al comparar los resultados histopatológicos obtenidos en los dos casos, se encontraron las mismas lesiones en los mismos órganos (hígado, útero y riñones). También se observó una pérdida de peso de los animales que consumieron hojas o extractos de la planta en comparación con los animales de control.

Descripciones macroscópicas

Los estudios macroscópicos de los úteros de las cobayas de experimentación mostraron metritis (inflamación de la pared del útero), hiperplasia (engrosamiento de la pared uterina) y un gran número de los úteros observados presentaban estado hemorrágico.

En los hígados se observaba hepatomegalia (aumento en el tamaño del hígado). En los riñones se presentaban cuerpos grasos. En varios casos se detectó olor desagradable y en la gran mayoría ascitis (acumulación de líquido en la cavidad peritoneal). Además se pudieron observar algunos fetos sin desarrollar. Los animales de control no mostraron casos anormales.

Descripción Histopatológica

Las lesiones histológicas observadas en las cobayas experimentadas varían en severidad de acuerdo con el tiempo de exposición y no si la planta se suministra en forma fresca o seca o en extracto acuoso o etanólico.

Los tejidos examinados fueron hígado, riñón y útero. Los cambios más significativos fueron los siguientes: El riñón presenta en general un proceso degenerativo ligero del epitelio de los tubulos contorneados proximales y distales con presencia ocasional de un material proteináceo en la luz de los mismos y con menos frecuencia en los tubulos colectores. En el tejido intersticial en algunos casos se encontró infiltración de células mononucleares. En la mayoría de los animales experimentales examinados, el glomérulo no mostró cambios específicos. Sin embargo, en algunos de ellos se observó un ligero engrosamiento de la capa parietal de Bowman.

El contraste con el riñón, en el hígado se observó un mayor número de cambios. Estos consistieron en procesos de degeneración parenquimatosa indistintamente si el animal recibió extracto acuoso o etanólico de la planta, sin embargo en los casos de extracto etanólico estos cambios fueron un poco más severos.

Igualmente se observaron cambios de metamorfosis grasa tanto en las cobayas que recibieron el extracto acuoso como el extracto etanólico pero este cambio fue mayor en los que recibieron el extracto etanólico. Como lesiones indicadoras de un proceso tóxico se destaca la megalocitosis (aumento del tamaño de las células si se compara con las normales) de los hepatocitos en la periferia de los lobulillos hepáticos, lo cual se podría explicar por la acción de las sustancias tóxicas que se absorben en el intestino para ser detoxificados por las células hepáticas siendo las primeras afectadas las de la periferia. Este cambio fue más frecuente en los animales que recibieron extracto etanólico. Se encontró además hiperplasia de conductos biliares de ligera a moderada sin observarse una diferencia entre el extracto acuoso o el etanólico. Este tipo de cambio en el hígado se asocia a un proceso de tipo tóxico. Es destacable también la hiperplasia de las células del sistema retículo endotelial que se encontró en la mayoría de los animales experimentales.

En el útero no se observaron cambios histológicos específicos. En general las estructuras uterinas presentaban los cambios normales de acuerdo con el ciclo astral.

Es importante no olvidar que los nitratos en una concentración de 5000 ppm pueden ser tóxicos para el ganado al reducirse a nitritos en el rumen, que reaccionan con la hemoglobina transformándola en metahemoglobina (18). Sin embargo el análisis de nitratos en el *Alnus acuminata* mostró una concentración menor (2000 ppm) y una sintomatología diferente, lo cual indica que posiblemente existen otras causas de aborto.

BIBLIOGRAFIA

1. H. SCHILDKNECHT and G. RAUCH, Z. NATUREFORSCH, 16 b, 422-7, (1961). C.A. 56, 10599 h., (1962).
2. C. Y. LI, K.C. LU, J.M. TRAPPE and W.B. BOLLEN, Microbios, 5(17), 65-68, (1972). B.A. 54(5), 38003, (1972).
3. Z.M. MITYAGINA, N.R. PSHENICHNOVA, Y.P. STARIKOVA, Tr. Perm. Farm. Inst. No. 2, 51-8, (1967). C.A., 71, 1979OV, (1969).
4. T. SUGA, T. HIDRATA, KOKAI, 73-78, 549, (1978). C.A. 89, 194143e, (1978).
5. R. CAHEN and J. POISSON, C.R. SEANCES Soc. Biol. Fil., 165 (4), 820-23, (1971). C.A., 55(1), 3976, (1973).
6. K. SHETH, E. BIANCHI, R. WIEDHOPF and J.R. COLE, J. Pharm. Sci., 62(1), 139-140, (1973). B.A. 55(12), 67885, (1973).
7. L.N. STANDIFER, M. DEVYS, M. BARBIER, Phytochemistry, 7(8), 1361-5, (1968).
8. S.K. TALAPATRA, P. CHATTOPADHYA-TA. B. TALAPATRA, J. INDIAN Chem. Soc., 60(2), 203, (1983), C.A., 98, 212890 P, (1983).

9. S. CHAPON and S. DAVID, Bull. Soc. Chim. France, 333-4, (1953). C.A., 48, 2078h, (1954).
10. J.J. KARCHESY, P.M. LOVELAND, M.L. LAVER, D.F. BAROFSKY, E. BAROFSKY, Phytochemistry 15(12), 2007-10, (1976).
11. G. ALEXA, L. BORS and E. MATEI, Bul. Inst. Politeh Iasis, 10(3-4), 157-64, (1964). C.A., 64, 927f, (1966).
12. R.A. FINNEGAN, P.L. BACHMAN and D. KHUTSON, LLOYDIA, 35(4), 457-460, (1972).
13. L. HORHAMMER, E. VORUDRAN and H. WAGNER, Arch. Farm., 289, 316-23, (1956). C.A. 51, 1533e, (1957).
14. M. SUAREZ y J. GONZALEZ, Resúmenes XVII Congreso Latinoamericano de Química, p. OPN-97-RI, 1986, Bogotá, Colombia.
15. A. SANABRIA, Análisis fitoquímico preliminar, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá, (1983).
16. E. GAVIRIA, Análisis de alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional, Bogotá, Colombia, Vol. 1, 121-122, (1984).
17. Y. ASAKAWA, F. GENJIDA, T. SUGA, Bull. Chem. Soc. Jap., 44(1) 297, (1971), C.A., 74, 108118 M, (1971).
18. A. URIBE, Anotaciones sobre los nitratos, los nitritos y otras sustancias nitrogenadas en el pasto Kikuyo. Revista Acovez, No. 30, p. 37, (1985).