

CARACTERIZACION DE LA FRACCION RESPONSABLE DEL EFECTO HIPOTENSOR DEL CROTON GLABELLUS*

Alba Luz Paredes**
Stella Luque R.**
Jorge E. Olarte C.***
Jairo Calle A.***

INTRODUCCION

El uso de extractos de plantas vegetales, con fines medicinales, ha sido una costumbre muy difundida en las poblaciones indígenas y campesinas de Colombia (1).

El *Croton glabellus* es una planta ampliamente distribuida en nuestro medio, conocida especialmente por los habitantes de climas cálidos y a la cual se le atribuyen empíricamente propiedades curativas, entre ellas una actividad antihipertensiva. En efecto, un primer trabajo realizado por M. Orjuela y M. Guáqueta (2) confirma una acción hipotensora, para extractos provenientes de esta planta, pero no se dilucida ni aclara el mecanismo de la acción; además se asume que la acción es producida por una fracción que no fue exactamente caracterizada, (posiblemente taninos), en la que se encuentra el o los componentes responsables de tal efecto. Hemos creído importante continuar el estudio del *Croton glabellus* con el propósito de aclarar el tipo de compuestos comprometidos en la acción y el mecanismo de la misma (3).

Por otra parte, este género ha sido ampliamente estudiado por numerosos autores quienes también reportan algunas propiedades biológicas de los compuestos extraídos de las diversas especies. (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

El material utilizado corresponde a las hojas del *Croton glabellus*, el cual es comúnmente co-

nocido como Algenonia (Tolima), Almizclillo (Tocaima), Algayubo (Tolima), Pulvide (Nariño) (2).

Sinónimos.

Croton niveus Billb (3, 8).

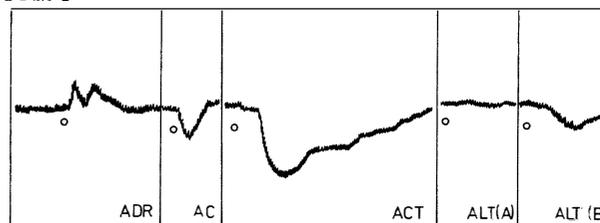
Material biológico

Para los ensayos farmacológicos se emplearon perros de ambos sexos de 15 a 22 kg. de peso.

Métodos

Antes de realizar la marcha fitoquímica, se comprobó el efecto hipotensor de los extractos totales (acuoso y alcohólico) de las hojas de la planta. Figura 1.

FIG. 1



Registro de presión arterial. Adrenalina (ADR): dosis (Do): 1 mcg/Kg. Acetilcolina (AC): 2 mcg/Kg, Extracto Acuoso Total (ACT): 1,2 mg/Kg, Extracto Alcohólico Tot. (ALT): 1,3 mg/Kg (A), y ALT 3,7 mg/Kg (B).

Se efectuó la marcha fitoquímica adaptada en el laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (14). De acuerdo con los resultados de esta marcha los diversos extractos fueron probados farmacológicamente pero sólo los que contenían alcaloides y flavonoides dieron respuestas positivas al efecto hipotensor.

Con base en lo anterior se diseñaron varios métodos para aislar y purificar los alcaloides y los flavonoides y poder precisar así cuál de estas fracciones era la responsable del efecto hipotensor.

* Trabajo realizado en el Departamento de Farmacia de la U. Nacional con el copatrocinio de Colciencias.

** Estudiantes de tesis

*** Profesores U. Nacional

A continuación describimos en detalle el método de extracción y separación que dio mejores resultados. Se tomaron 2 Kg de material vegetal seco y pulverizado, se extrajeron con 19 L de éter de petróleo en un soxhlet por un tiempo de 40 horas. El material vegetal desengrasado proveniente del tratamiento anterior se sometió a extracción con 18 L de etanol al 95% en un soxhlet, obteniéndose 260 gramos de extracto alcohólico (EAT) y un residuo que se desechó. Se tomaron 220 gramos de extracto alcohólico seco (EAT) (sin alcohol) y se extrajeron con 3 x 400 ml de cloroformo, los extractos clorofórmicos se reunieron, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron en un rotavapor obteniéndose un extracto (III-EC). El residuo anterior (extracto blando EAT) se trató con 3 x 200 ml de éter etílico, los extractos se reunieron, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se concentraron en un rotavapor, se obtuvo un extracto (III-EE). Al residuo anterior se reunieron los extractos, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se concentraron en un rotavapor y se obtuvo un extracto (III-AF).

Para la obtención de alcaloides y flavonoides se utilizaron los extractos (III-EC) y (III-AF), porque son los que contienen dichos compuestos en mayor cantidad. (Tablas I y II).

Tabla I

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA ALCALOIDEOS CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DEL METODO RECOMENDADO

Extractos	Valser	Mayer	Wagner	Dragendorff	Reineckato
III-EC	+++	+++	+++	+++	—
III-EE	++	++	++	++	—
III-AE	+	+	+	+	—
III-AF	—	—	—	—	—
III-CE	+++	+++	+++	+++	—
III-EEF	—	—	—	—	—

— = negativo
 + = escaso
 ++ = apreciable
 +++ = abundante

Para la extracción y purificación de los alcaloides se tomó el extracto (III-EC), se trató con una mezcla de ácido clorhídrico al 5% y etanol al 95% en una proporción de (17:3), con el fin de aumentar la polaridad del solvente utilizado. Luego se reunieron los extractos ácidos, se filtraron eliminándose el residuo, el filtrado se alcalinizó con hidróxido de sodio al 5% hasta pH 10.

De esta solución alcalina se extrajeron los alcaloides con una mezcla de cloroformo - etanol (4:1) se concentraron y se obtuvo el extracto (III-CE).

Tabla II

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS PARA FLAVONOIDES CON LAS FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR DEL METODO DE EXTRACCION RECOMENDADO

Extractos	Cloruro Férrico 10%	Shinoda
III-EC	+++	—
III-EE	+++	—
III-AE	+++	++
III-AF	+++	+++
III-CE	—	—
III-EEF	+++	++

Para la extracción y purificación de los flavonoides se tomó el extracto (III-AF) el cual se disolvió en agua destilada quedando un residuo y un extracto acuoso después de filtrar. Al residuo se le efectuó la prueba para flavonoides (Shinoda) obteniéndose una coloración débil lo cual indica la escasa presencia de estos compuestos, por lo cual fue desechado.

El extracto acuoso (Filtrado hidroalcohólico) se trató con éter etílico 2 x 2 l y los extractos etéreos se secaron con sulfato de sodio anhidro, se concentraron en un rotavapor y se obtuvo el extracto (III-EEF). Con cada uno de los extractos anteriores se hicieron pruebas farmacológicas para confirmar el efecto sobre la presión arterial. Para determinar el número de flavonoides presentes en el extracto (III-EEF) se hizo cromatografía en capa delgada. Se usó el sistema solvente benceno-acetato de etilo-metanol-ácido acético-agua (40:30:20:5:5) y como revelador una mezcla de cloruro férrico y ferricianuro de potasio en partes iguales; se observaron 2 manchas bien diferenciadas.

La separación de los flavonoides se hizo por cromatografía preparatoria en capa delgada utilizando el mismo solvente y revelador. Finalmente los flavonoides se obtuvieron raspando 3 bandas de la cromatografía y extrayéndolos por separado con una mezcla de etanol - agua (70: 30), filtrando y concentrando en un rotavapor.

Con los flavonoides totales (III-EEF) y con cada una de las tres fracciones obtenidas por cromatografía, se hicieron ensayos farmacológicos para evaluar el efecto hipotensor y su posible modificación por la atropina o por la vagotomía bilateral.

El efecto hipotensor se evaluó observando las variaciones de presión arterial (arteria carótica), de los perros anestesiados con pentobarbital 40 mg/kg V.I.P. Los extractos y las drogas de referencia como la adrenalina, la acetilcolina y la atropina se administraron a través de la vena safena. Las variaciones se midieron con un manómetro de mercurio y se registraron en un quimógrafo. Todas las fracciones ensayadas fueron disueltas previamente en solución salina.

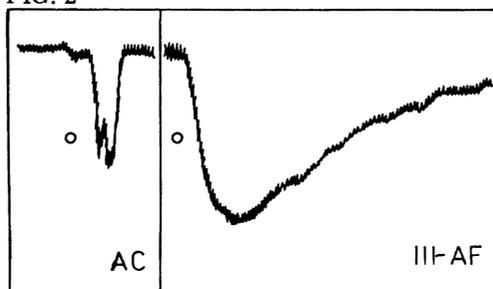
Para estudiar la posible acción muscarínica se trabajó con animales atropinizados. Se practicó además vagotomía bilateral en algunos animales con el objeto de localizar la acción a nivel central o periférico.

Finalmente, se administraron las dosis de los extractos a cortos intervalos de tiempo para observar la constancia de la respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSION

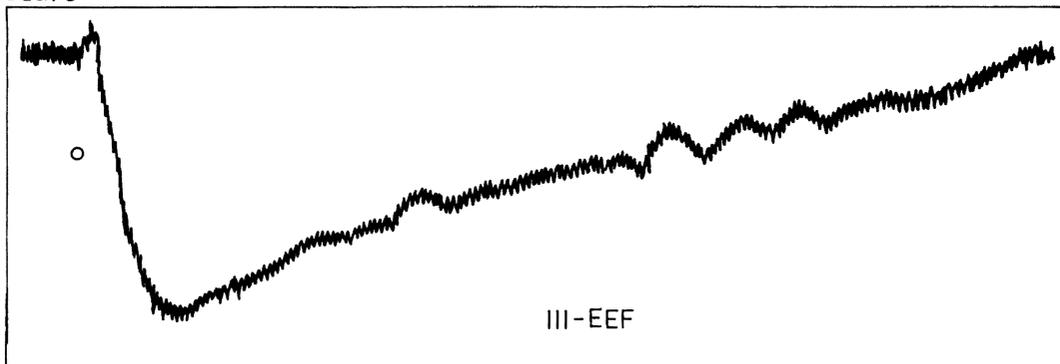
Los resultados del estudio fitoquímico, demuestran la presencia de esteroides, alcaloides y flavonoides como metabolitos secundarios importantes (Tablas I y II). Sin embargo, solamente los flavonoides presentan una respuesta hipotensora en el animal experimental en las condiciones de nuestro ensayo (Figuras 2, 3 y 4). Este resultado desvirtúa la presencia de taninos reportada anteriormente (2) y por lo tanto su intervención en el efecto hipotensor de las hojas del *Croton glabellus*.

FIG. 2



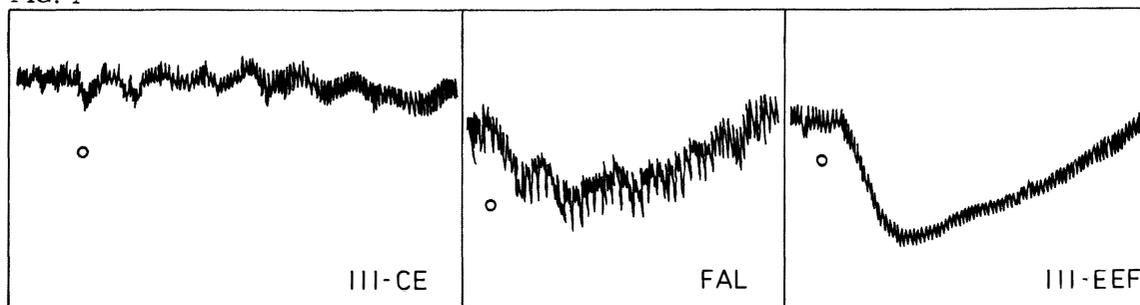
Efecto sobre la presión arterial de: Acetilcolina (AC). Dosis: 2 mcg/Kg.
Exto. III-AF, Dosis: 8,5 mg/Kg.
Exto. III-AC, Dosis: 4,9 mg/Kg.

FIG. 3



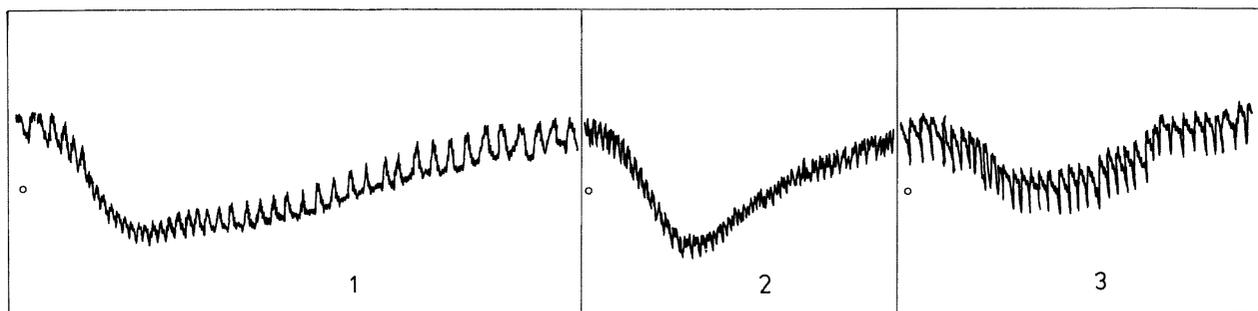
Efecto hipotensor del extracto III-EEF.
Dosis: 1,56 mg/Kg.

FIG. 4



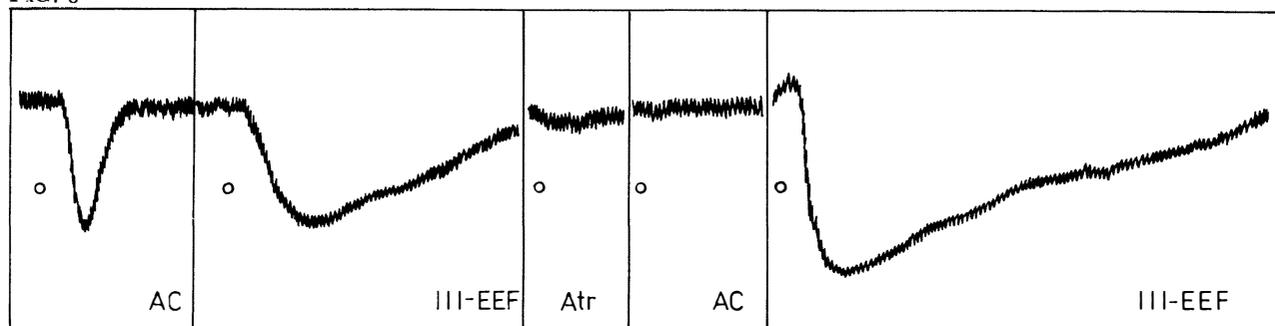
Efecto sobre la presión arterial observado tras la administración de:
Exto. de alcaloides (III-CE), extraído con ácido cítrico 0,1 N. Dosis: 4,9 mg/Kg,
Mezcla Alcaloides-Flavonoides (FAL) 2:2, y Exto. III-EEF. 1,5 mg/Kg.

FIG. 5



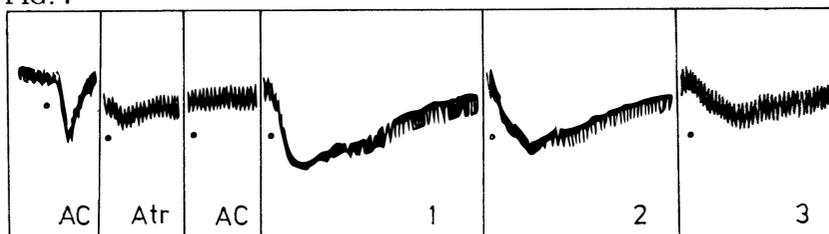
Efecto hipotensor de las fracciones 1,2 y 3 del Exto. III-EEF. Dosis: 1,45, 0,12 y 2,65 mg/Kg, respectivamente.

FIG. 6



Efecto de Acetilcolina (AC) y del extracto III-EEF en dosis de 2 mcg/Kg y 1,5 mg/Kg respectivamente, sobre la presión arterial antes y después de la administración de Atropina (ATR): 0,5 mg/Kg.

FIG. 7



Efecto sobre la presión arterial de las fracciones del Exto. III-EEF. Dosis: 1: 1,9 mg/Kg. 2: 1,7 mg/Kg. 3: 2,6 mg/Kg., en animal atropinizado.

Los flavonoides presentes en las hojas son compuestos relativamente estables. A medida que se avanza en el proceso de purificación su actividad se acentúa y se requiere de muy pequeñas dosis para alcanzar el efecto hipotensor. Tales compuestos aparecen en forma abundante en las hojas, en relación con los demás componentes.

La cromatografía preparativa en capa delgada pone en evidencia la presencia de 3 tipos de flavonoides, las 3 fracciones obtenidas producen

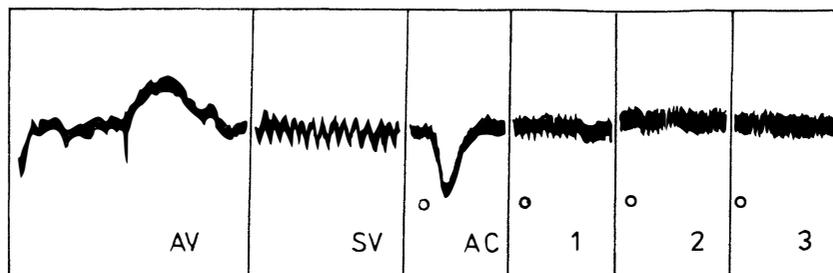
un efecto hipotensor en el animal experimental (Figura 5).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el animal atropinizado se descarta una acción de tipo muscarínico (Figuras 6 y 7).

Los resultados observados en el animal vagotomizado sugieren una acción central o refleja (Figura 8).

El fenómeno de taquifilaxia se observa claramente tanto en el efecto producido por los flavonoides totales, como por cada una de las 3 fracciones (Figuras 9 y 10).

FIG. 8



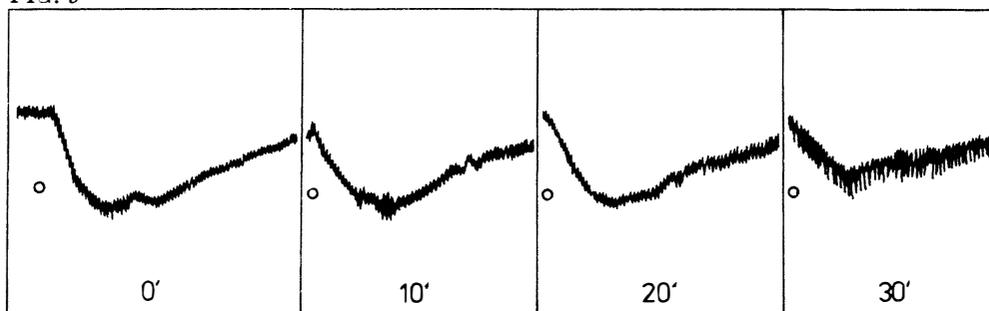
Efecto sobre la presión arterial de las fracciones 1, 2 y 3 del extracto III-EEF en el animal vagotomizado, administradas en dosis de 1,6, 1,7 y 2,6 mg/Kg respectivamente.

AV: Atadura de Vagos

SV: Sección de Vagos

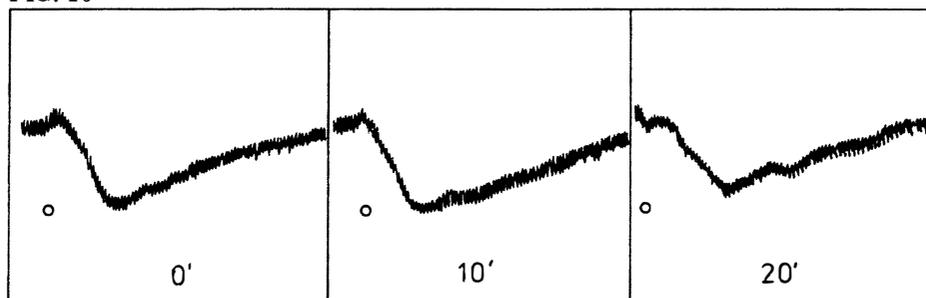
AC: Acetilcolina. Dosis: 2 mcg/Kg.

FIG. 9



Variaciones del efecto hipotensor producido por el Exto. III-EEF a dosis de 0,9 mg/Kg, repitiendo la aplicación a intervalos de 10 minutos.

FIG. 10



Variaciones de la presión arterial causadas por la fracción 2, a intervalos de 10 minutos. Dosis: 1,7 mg/Kg. (Exto. III-EEF).

CONCLUSIONES

1. La fracción responsable del efecto hipotensor del *Croton glabellus* la constituyen los flavonoides. Los alcaloides no intervienen en dicha acción.

2. Tanto el extracto original de los flavonoides como las tres fracciones obtenidas por separación cromatográfica presentan una acción hipotensora persistente sobre la presión arterial sanguínea, que no es bloqueada por la atropina y que desaparece al ser seccionados los Vagos, concluyéndose por tanto que dicha acción no es del tipo muscarínico, y que su mecanismo es a nivel central o reflejo.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del Fondo Colombiano de Investigación Científica

y Proyectos Especiales (Colciencias), para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Se realizó un estudio fitoquímico y farmacológico de las hojas del *Croton glabellus*. Se aislaron los flavonoides como metabolito secundario responsable del efecto hipotensor, determinado en perros anestesiados, a través de la arteria carótida.

SUMMARY

We realized a phytochemical and pharmacological study with the leaves of *Croton glabellus*. We isolated the flavonoids as secondary metabolites, responsible for the low blood pressure effect on anesthetized dogs through carotid artery.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. PEREZ, E., Plantas Útiles de Colombia, Contraloría General de la República, Bogotá, 337-338, 1947.
2. GUAQUETA, M., ORJUELA, M., Estudio Farmacológico del *Croton glabellus*, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 1979. Trabajo de grado para optar al título de Químico Farmacéutico.
3. PAREDES, A.L., LUQUE, S., Caracterización de la fracción responsable del efecto hipotensor del *Croton glabellus*, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, 1981. Trabajo de grado para optar al título de Químico Farmacéutico.
4. STENLID, G., Flavonoids as Inhibitor of The Formation of Adenosine Triphosphate in Plant Mitochondria, *Phytochemistry*, 9, No. 11, 2251-2256, 1970.
5. MATUSSIS, I, y col., Variations occurring in the Blood Coagulation System and in the Development of Hemorrhagic Syndrome with Ascorbic Acid and Bioflavonoid Deficiency in the Body. *Altai Inst. Med., Barnaul. Vopr Pitaniya* 23, No. 1, 22-26, 1964. Tomado del Chem. Abstr. 60, No. 10, 13632f, 1964.
6. MANOLOV, P., DALEVA, L., Pharmacological Study of a Preparation Based on a Flavonoid Mixture from *Crataegus monogyna*, *Navchoizsled Khim. Farm. Inst. Sofia. Farmatsiya* 19, No. 3, 38-44, 1969. Tomado del chem. Abstr. 72, No. 3, 11223n, January 19 de 1970.
7. GLEISSMAN, T.A. The Chemistry of Flavonoid Compounds, The McMillan Company, New York, 1-626, 1962.
8. FARNSWORTH, R.N., KING, J. y col. A Phytochemical and Biological Review of the Genus *Croton*, *Lloydia*, 32, No. 1, 1-28, March, 1969.
9. SANKARA, S.; NAGARAJAN, S., Flavonoids of Some Euphorbiaceous Plants, *Phytochemistry*, 10, 2548-2550, 1971.
10. ROJAS, E., RODRIGUEZ, L., Nivenolide, a Diterpene Lactone from *Croton niveus*, *Phytochemistry*, 17, No. 3, 572, 1978.
11. WAGNER, H., HORHAMMER, L. Flavon-C-glykoside in *Croton zambezicus*, *Phytochemistry*, 9, No. 4, 897, 1970.
12. PONSINET, G, OURISSON, G., Etudes Chimio-Taxonomiques dans la Famille des Euphorbiacees, *Phytochemistry*, 4, No. 6, 799-811, 1965.
13. FERNANDEZ, M., VEGA, F. y col., Los Flavonoides, *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 43, 499-517, 1977.
14. CALDERON, E., Guía para el Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, 38, 1963.