

Efectos de la administración aguda y subaguda de extractos de *Pimenta dioica* (Myrtaceae) en ratas albinas normotensas e hipertensas

Adriana Suárez Urhan¹, Guido Ulate Montero¹ y José F. Ciccio²

¹ Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica.

² Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

(Rec. 28-VII-1995. Rev. 3-XI-1995. Acep. 22-II-1996)

Abstract: The intraperitoneal administration of different extracts of *Pimenta dioica* (L.) Merrill (Myrtaceae) to conscious normotensive and hypertensive rats caused a depression of the central nervous system (CNS). The intensity of this depression depends on the dose. Analgesic and hypothermic effects were also observed. The total aqueous extract was more effective than the ethanolic extract and the final aqueous fraction was the most effective. The peritoneal irritation caused by the extract explains only partially the depressive effect over the CNS. When the final aqueous fraction was given orally to SDN and SHR rats during 14 days there was no observed change on the systolic blood pressure, heart rate and weight of the animals.

Key words: *Pimenta dioica*, general and cardiovascular effects, Hippocratic screening, traditional medicine.

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace varios miles de años (Farnsworth 1985). Recientemente la utilización de la medicina tradicional ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una alternativa económicamente viable para poblaciones de países en desarrollo (Akerle 1988). Es necesario el estudio científico del potencial farmacológico de los extractos vegetales utilizados en la medicina popular y más importante aún valorar su inocuidad (Farnsworth 1989).

Frecuentemente la investigación de los productos naturales se orienta a la búsqueda de una sola actividad biológica específica lo que no permite identificar otras posibles actividades de importancia (Sánchez 1993). Es necesario someter a los extractos de plantas medicinales a un ensayo general inicial donde sea posible identificar el verdadero potencial biológico de los mismos (Anónimo 1991). El ensayo hipocrático es una de éstas pruebas iniciales a las que se deben de someter los extractos crudos de plantas (Malone

1962). Este permite detectar actividades biológicas que pueden ser muy diversas, da información toxicológica inicial, orienta sobre qué otras pruebas biológicas se deben de efectuar con el extracto y guía el fraccionamiento químico del extracto según la actividad biológica de las fracciones (Sandberg 1987).

La *Pimenta dioica* (L.) Merrill es un árbol que pertenece a la familia Myrtaceae, originario del Caribe y Centroamérica (Rogers 1963) y popularmente conocido en Costa Rica como "Jamaica". Su principal uso es como especia o condimento (Grieve 1971). En la medicina popular centroamericana se utilizan las hojas para el tratamiento de la hipertensión arterial, "azúcar en la sangre", obesidad y trastornos digestivos diversos (Vargas 1990). En el Caribe se utilizan en el tratamiento de la dismenorrea y de dolores abdominales (Asprey *et al.* 1953).

Hasta donde se tiene conocimiento no hay informes sobre los efectos biológicos generales *in vivo* ni cardiovasculares de *P. dioica*.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes: 1. Describir los efectos biológicos generales de diferentes extractos de hojas de *P.dioica* administrados por vía intraperitoneal en ratas albinas normotensas e hipertensas concientes, 2. Describir los efectos del extracto con mayor actividad biológica sobre la presión arterial sistólica (PAS), la frecuencia cardíaca (FC) y el peso corporal de ratas albinas concientes normotensas e hipertensas al administrarlo oralmente en dos dosis diferentes por un período de catorce días.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos de plantas: Los extractos se prepararon con las hojas de *P. dioica* recolectadas en San Joaquín de Flores, Heredia durante los meses de noviembre de 1993 y enero de 1994. Se depositó un ejemplar herborizado en el Herbario de la Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, bajo el número USJ 508060.

Un kilogramo de hojas frescas fue extraído con 10 L de agua destilada a 70°C durante 20 minutos. Luego se filtró y se concentró al vacío a 40°C hasta obtener 2.4 L. La mitad de este concentrado fue liofilizado obteniéndose 64.2 g de polvo amarillento, que se llamó extracto acuoso total. La otra mitad del concentrado fue extraído sucesivamente con hexano, acetato de etilo y *n*-butanol, previamente purificados por destilación, para obtener 0.4 g, 2.9 g y 14.8 g respectivamente, quedando un remanente de 28.6 g que se identificó como la fracción acuosa final.

El extracto etanólico se preparó con 500 g de hojas frescas maceradas en etanol 95°C durante 72 hr. Luego se filtró y concentró al vacío hasta 200 mL que se liofilizaron obteniendo 65.5 g de extracto seco en forma de sólido amarillento subdividido.

El extracto acuoso total, la fracción en *n*-butanol y la fracción acuosa final se disolvieron en solución salina fisiológica para ser administrados por vía intraperitoneal a los animales. El extracto etanólico y las fracciones en hexano y acetato de etilo del extracto acuoso se disolvieron en una solución de propilenglicol al 10% con solución salina.

Para la administración oral de la fracción acuosa final se utilizó agua destilada para disolver el extracto.

Ensayo hipocrático: Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley (SDN) y Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) con un peso entre 175 y 275g. El alimento y el agua se retiraron durante las seis horas de observación posteriores a la administración del extracto, después de esto se permitieron *ad libitum*. El extracto se administró intraperitonealmente en diferentes concentraciones, manteniéndose el volumen inyectado alrededor de 0.5 ml.. Para cada extracto se inició el estudio con una dosis de 500 mg/kg. Cuando esta dosis resultó letal o mostró una actividad biológica elevada se ensayó con dosis menores hasta encontrar una dosis inefectiva. En aquellos extractos con actividad

biológica se inyectaron dos ratas por cada nivel de dosis para un mínimo de seis ratas por extracto y un óptimo de diez. Para los extractos inactivos, se utilizaron dos ratas para 500 y 1000 mg/kg respectivamente. Además se realizó el ensayo con ratas control a las cuales se les inyectó el mismo volumen del vehículo en el cual se diluyó el extracto. Se hicieron controles con solución salina 0.9% (p/v) y con propilenglicol al 10%. Se realizaron observaciones a los 5, 15, 30, 60, 90, 120 min, 4, 6, 24 y 48 hr después de inyectada la rata. Los signos y síntomas inducidos por la inyección intraperitoneal de los extractos fueron registrados y calificados según el método de Malone y Robichaud (1962) modificado por Sandberg (1967). En la hoja de registro, los parámetros observados están agrupados en aquellos que indican depresión del sistema nervioso central (SNC), estimulación del SNC, parámetros obtenidos de la observación de los ojos y orejas, efectos generales y efectos subjetivos.

Se realizó una autopsia a todos los animales, ya sea en el momento de su muerte por efecto del extracto o al finalizar el ensayo. Se hizo una observación macroscópica de los principales órganos (corazón, pulmones, hígado, riñones e intestinos) anotando además la presencia o ausencia de irritación peritoneal.

Administración oral del extracto: Se utilizaron doce ratas adultas machos SDN y doce ratas SHR con un peso inicial entre 200 y 250 g. Los animales se mantuvieron los catorce días que duró el experimento a temperatura ambiente (22-26 °C), con un ciclo luz-oscuridad de 12:12 y fueron ubicados dos animales por jaula en el laboratorio de animal intacto del Departamento

de Fisiología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica recibiendo alimento granulado (Piensos S.A., San José, Costa Rica) y agua potable *ad libitum*.

El número total de la muestra se calculó según la fórmula $n = [(z) (s)/ \text{error máximo permitido}]^2$, $[(1.96)(20)/ 8]^2 = 24$; y el diseño experimental consistió en un modelo de bloques completos aleatorizados. Para cada tipo de rata (normotensas e hipertensas), se hicieron tres grupos de cuatro ratas cada uno. A un grupo se le dio agua destilada (0.1 ml/ 100 g de peso corporal) dos veces al día, y a los otros dos grupos se les administró la fracción acuosa final del extracto acuoso de *P. dioica* en dos dosis diferentes: 140 y 280 mg/kg por día, divididas en dos administraciones diarias (8:00 a.m. y 5:00 p.m.) durante catorce días. La administración del extracto y del agua destilada fue *per os*, utilizando una cánula metálica intragástrica (16G x 3).

Los siguientes parámetros fueron medidos en el sétimo, décimo y último día del experimento: peso (g), presión arterial sistólica (mmHg) y frecuencia cardíaca (lat/min).

Para la medición de la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca se utilizó un manguito inflable y un microfono colocados a un polígrafo fisiológico marca NARCO BIO System Inc.

Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar. Se realizó un GLM (*General Linear Model*) utilizando el paquete estadístico SAS para analizar la influencia de los diferentes tratamientos y tipos de rata sobre los parámetros: peso, frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Ensayo hipocrático: Los resultados del ensayo hipocrático en las ratas normotensas, según el tipo de extracto y dosis administrada se resumen en el cuadro 1. Las ratas inyectadas con la fracción extraída con hexano, no presentaron cambios fisiológicos importantes. El resto de las fracciones produjeron signos y síntomas semejantes: disminución de la actividad motora, pérdida del reflejo de enderezamiento, analgesia, pérdida de la actividad prensil especialmente en

miembros traseros, pérdida de la reacción de alarma e hipotermia. En todos los casos los signos fueron dosis-dependientes y la duración e intensidad de los signos disminuía cuando la dosis del extracto se hacía más pequeña. La dosis letal estuvo entre 125 y 250 mg/kg para el extracto acuoso total, el extracto etanólico y la fracción en *n*-butanol. Para la fracción en acetato de etilo y la fracción acuosa final estuvo entre 250 y 500 mg/kg. En todas las autopsias de los animales que murieron por efecto del extracto se observó como único hallazgo positivo, una irritación peritoneal importante caracterizada por congestión venosa y la presencia de líquido intraperitoneal. No se observó daño macroscópico en los principales órganos. Las autopsias realizadas al finalizar el ensayo fueron todas negativas.

El extracto etanólico no presentó un efecto analgésico tan marcado como el extracto acuoso total. La fracción acuosa final provocó signos y síntomas como disminución de la actividad motora, pérdida del reflejo de enderezamiento, analgesia, pérdida de la actividad prensil, pérdida de la reacción de alarma y disminución de la temperatura rectal a la dosis de 250 mg/kg sin causar la muerte de los animales.

Al dar la fracción acuosa final a ratas SHR en dosis de 500, 250 y 125 mg/kg se observó que tanto 250 como 500 mg/kg fueron letales para todos los animales. Con 500 mg/kg la respuesta se inicia a los 15 min de administrado el extracto con disminución progresiva de la actividad motora y analgesia similares a las observadas en ratas SDN. Sin embargo, la disminución y pérdida del reflejo de enderezamiento, de los reflejos corneal y pineal, la pérdida de la actividad prensil, pérdida de la reacción de alarma, la palidez y cianosis fueron menos evidentes en las ratas SHR. Con la dosis de 250 mg/kg los signos observados durante las primeras 6 horas fueron escasos a pesar de que todos los animales murieron antes de 24 hr. Se observó una leve disminución de la actividad motora y disminución de la temperatura rectal lo cual fué evidente con todas las dosis. Con 125 mg/kg sólo se observó una leve disminución de la actividad motora. En la autopsia de las ratas que murieron por efecto del extracto se observó irritación peritoneal con presencia de líquido intraperitoneal. En otros órganos no se observaron lesiones. Las autopsias realizadas a las 48 hr fueron negativas.

CUADRO 1

Efecto máximo de diferentes extractos de Pimenta dioica administrados por vía intraperitoneal a ratas concientes Sprague Dawley

Extracto	Dosis mg/kg	Disminución actividad motora	Pérdida reflejo endereza-miento	Analgesia	Pérdida reflejo corneal pineal	Pérdida actividad prensil	Pérdida reacción alarma	Tamaño pupila (mm)	Palidez	Cianosis	Disminución temperatura	Otros signos °C
Acuoso Total	500	+3	+3	+2	+1	+4	+4	4	+2	+2	3.8	Mortalidad 100% 3-5 hr
	250	+2	+1	+2	0	+3	+3	2	+1	+1	3.4	Mortalidad 100% 4-6 hr
	125	+1	0	+1	0	0	+1	2	0	0	2.4	
	50 10	+1 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	2 1.5	0 0	0 0	3.2 2.2	
Etanol	500	+3	+3	+1	+1	+4	+3	3	+1	+1	3.2	Mortalidad 100% 4-6 hr
	250	+2	+2	+1	0	+1	0	2	+1	0	3.7	Mortalidad 100% 6-24 hr
	125	+2	0	0	0	0	0	2	0	0	2.0	
Hexano Acetato de etilo	500	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2.6	
	500	+2	0	+1	0	0	0	2	+1	0	3.7	Mortalidad 100% 6-24 hr
	250	+1	0	0	0	0	0	1	0	0	2.9	
n-butanol	125	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2.8	
	500	+3	+2	+1	0	0	0	3	+1	0	2.3	Mortalidad 100% 4-24 hr
	250 125	+3 +1	+2 0	+1 0	0 0	0 0	0 0	3 2	0 0	0 0	3.4 3.0	
Acuoso final	500	+3	+4	+2	+1	+4	+4	3.5	+1	+2	3.5	Mortalidad 100% 4-24 hr
	250 125	+3 +1	+1 0	+1 +1	0 0	+3 0	+1 0	2.5 1.0	+1 0	0 0	4.5 1.5	

En las ratas controles a las cuales se les inyectó solución salina al 0.9% p/v y propilenglicol al 10% no se observaron signos de ningún tipo de actividad. Sí se observó una leve disminución de la temperatura rectal que en promedio fué de 1.2 °C. Las autopsias todas fueron negativas.

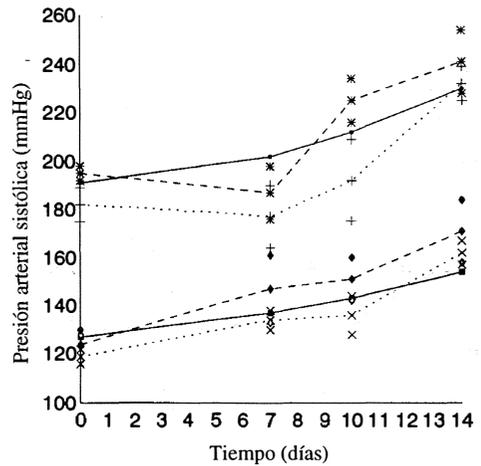
Administración oral del extracto: Los cambios en la P.A.S. durante las dos semanas en que se administró oralmente la fracción acuosa final, se muestran en la Figura 1. A lo largo de este período todas las ratas presentaron un incremento de las cifras de P.A.S., y esta tendencia no fue modificada por la administración de dicha fracción. La administración de la fracción no causó en ningún momento diferencias significativas en la P.A.S. entre los grupos tratados y el grupo control en ninguno de los dos tipos de rata y en ninguna de las dosis. Claramente se observó que los dos tipos de rata manejaban P.A.S. diferentes ($p < 0.05$) lo que no se alteró por la administración del extracto. En todo momento las cifras de P.A.S. de las ratas SHR fue mayor que la de ratas SDN ($p < 0.05$).

La FC fue siempre mayor en las ratas SHR que en las ratas SDN ($p < 0.05$) excepto por la FC a los 14 días de tratamiento donde no hubo diferencia según el tipo de rata. La administración del extracto en dos dosis diferentes no provocó cambios en la FC de los grupos tratados comparados con el grupo control en ninguno de los dos tipos de rata. Las diferencias en FC entre los dos tipos de rata no se debieron al tratamiento con el extracto.

La evolución del peso corporal durante los 14 días de tratamiento mostró una clara tendencia hacia la ganancia de peso. La administración del extracto no provocó diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en ninguna de las dos dosis administradas y en ninguno de los dos tipos de ratas. El peso de las ratas SHR siempre fue menor que el de las SDN ($p < 0.05$) sin que influyera en esto la administración del extracto.

DISCUSIÓN

El ensayo hipocrático es una prueba multidimensional utilizada al inicio del estudio de extractos de plantas medicinales para detectar ac-



Tipo de rata y dosis

- △— SHR control
- +— SHR 140 mg/kg
- *— SHR 240 mg/kg
- SDN control
- ×— SDN 140 mg/kg
- ◆— SDN 240 mg/kg

Fig. 1. Variación de la presión arterial sistólica en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*.

tividades biológicas diversas, orientar el fraccionamiento fitoquímico y decidir sobre la utilización de pruebas más específicas según los resultados obtenidos (Anónimo 1991). En el presente ensayo se observó que tanto el extracto acuoso total como el extracto etanólico causaban signos dosis-dependientes de disminución de la actividad motora, pérdida de los reflejos de enderezamiento, corneal y pineal, pérdida de la reacción de alarma y analgesia. Estos efectos sugieren una actividad depresora del sistema nervioso central presente en los dos tipos de extracto. Sin embargo, la actividad analgésica fue más marcada en el extracto acuoso total y la pérdida de la reacción de alarma también fue mayor. Con los dos extractos se observó midriasis y palidez de las orejas lo que sugiere una activación del sistema nervioso simpático. La pérdida de la actividad prensil sugiere alteraciones del tono muscular esquelético. La cianosis pre-mortem puede explicarse por

trastornos de la función pulmonar probablemente por la depresión del SNC y la pérdida del tono muscular. La presencia de un efecto analgésico en ambos extractos coincide con su uso en la medicina popular para el tratamiento de dolores abdominales (Asprey *et al.* 1953). El trauma de la inyección intraperitoneal con la irritación peritoneal ocasionada por el extracto podría explicar parte de la disminución de la actividad motora y de la pérdida del reflejo de enderezamiento pero no explica la totalidad de signos que indican depresión del SNC.

Por ser más efectivo, el extracto acuoso total fue fraccionado encontrándose que la actividad biológica se pierde o disminuye mucho en ciertas fracciones (hexano y acetato de etilo) y permanece casi intacta en otras (fracción acuosa final y *n*-butanol).

La fracción acuosa final del extracto acuoso fue tan efectiva como el extracto acuoso total a la dosis de 500 mg/kg e inclusive causó una mayor pérdida del reflejo de enderezamiento. Los efectos observados con esta fracción también fueron dosis dependientes. La fracción en *n*-butanol se comportó de manera similar pero a 250 mg/kg presentaba un 100% de mortalidad lo que no se observó con la fracción acuosa final a pesar de que sí se observaron una gran variedad de signos de efectividad. Todo esto hace pensar que la fracción acuosa final del extracto acuoso es la más rica en las sustancias biológicamente activas y es ésta la fracción que debe ser mejor estudiada.

El efecto depresor del SNC podría estar implicado en el efecto terapéutico atribuido por la medicina popular a la planta cuando es utilizada en el tratamiento de la hipertensión arterial (Vargas 1990). Sin embargo, al administrarse durante 14 días por vía oral, la fracción acuosa final no tiene efecto alguno sobre la presión arterial sistólica lo que no coincide con el uso popular de la planta. Esto se puede deber a muchas razones dentro de las cuales se puede mencionar el hecho de que la sustancia biológicamente activa tenga una función selectiva dentro del SNC y no afecte a los centros de regulación cardiovascular por lo que no afecte la presión arterial. También no se puede descartar que la vida media de la sustancia biológicamente activa sea muy corta y que la dosificación tenga que realizarse en forma más frecuente.

Se nota que todos los extractos y fracciones provocan una disminución de la temperatura

rectal. Esta es una acción biológica no esperada ya que en la literatura consultada no hay reporte alguno sobre su uso como antipirético. Se sugieren estudios posteriores dirigidos a esclarecer esta acción.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Norman R. Farnsworth (College of Pharmacy of the University of Illinois at Chicago) por su gentileza al permitirnos el acceso a la base de datos NAPRALERT. A Jorge Gómez-Laurito (Escuela de Biología, U.C.R.) por realizar la clasificación de la especie. A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto No. 422-93-243) y al CYTED (Proyecto X-1) por el apoyo brindado.

RESUMEN

La administración por vía intraperitoneal de diferentes extractos de *P. dioica* a ratas albinas normotensas e hipertensas concientes causa una depresión del SNC. La intensidad de esta depresión dependió de la dosis. También se observó un efecto analgésico e hipotérmico. Con el extracto acuoso total se vió una mayor actividad biológica que con el extracto etanólico y la fracción acuosa final del extracto acuoso fue la que mostró la mayor actividad biológica de las fracciones. La irritación peritoneal causada por el extracto explica sólo en parte la acción depresora del SNC. Al administrar por vía oral la fracción acuosa final del extracto acuoso a ratas SDN y SHR durante 14 días no se vió efecto alguno sobre la presión arterial sistólica, frecuencia cardíaca y el peso corporal.

REFERENCIAS

- Akerle, O. 1988. Medicinal Plants and Primary Health Care: an agenda for action. *Fitoterapia* 59: 355-363.
- Anónimo. 1991. Reunión anual de la Red Iberoamericana de Productos Naturales de uso medicinal. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Sao Paulo, Brasil. p. 15-19.
- Asprey, G.F. & P. Thornton 1953. Medicinal Plants of Jamaica. Part I. *West Indian Med. J.* 24: 233-252.
- Farnsworth, N.R. 1985. La medicina moderna y las plantas: un encuentro entre la ciencia y el folklore. *Foro Mundial Salud* 6: 89-94.
- Farnsworth N.R., O. Akerel, A.S. Bingel, D.D. Soejarto & Z. Guo. 1989. Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 107: 314-329.

- Grieve M. 1971. A Modern Herbal. Dover, Nueva York. p.19-21.
- Malone, M.H.& R.C. Robichaud. 1962. A Hippocratic Screen for Pure or Crude Drug Materials. *Lloydia* 24:320-332.
- Vargas, S. 1990. Plantas medicinales: la naturaleza como guardián de su salud. Mundo Gráfico, San José, Costa Rica. 55 p.
- Rogers Mc. 1963. Flora de Guatemala . *Field. Bot.* 24:382-385.
- Sánchez ,C., M.Gupta, M.Vásquez, Y.M.Noriega & G. Montenegro 1993. Bioensayo con *Artemia salina* para predecir la actividad antibacteriana y farmacológica. *Rev Médica Panamá* 18:62-69.
- Sandberg, F. 1967. Pharmacological Screening of Medicinal Plants. Government, Colombo, Shrilanka. p 1-15.
- Sandberg, F. 1987. The Integrated Natural Products Research in the Development of Plant-derived Pharmaceuticals. *Fitoterapia* 57: 309-313.