

Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* L. var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación.

FABIOLA SALAS^a, CARLOS CIANGHEROTTI^b, MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN^b,
JANNE ROJAS^{a*}, ANTONIO MORALES^a

^a Grupo de investigación Biomoléculas Orgánicas. Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de los Andes, Mérida. Venezuela.

^b Laboratorio de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. *Autor de contacto, e-mail janner@ula.ve

Recibido Octubre 2006 - Aceptado Mayo 2007

RESUMEN

En este trabajo se reporta la toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de *Vismia baccifera* var. *dealbata* (VIB) en animales de experimentación. La dosis tóxica media obtenida en la determinación de la toxicidad aguda fue de 420 mg/Kg., exhibiendo los animales el signo de caminata en alzada como efecto tóxico más representativo, no observándose letalidad a ninguna de las dosis ensayadas. Actividad analgésica significativa fue observada a los 30 minutos post-tratamiento a la dosis de 210 mg/kg de extracto acuoso de hojas de VIB con respecto al control ($p < 0,05$), mostrando un efecto analgésico similar al del ácido acetilsalicílico (ASA, analgésico de referencia) a ese tiempo, pero menor al de la morfina (analgésico opioide de referencia). Se requiere estudios adicionales a fin de establecer el posible mecanismo de este efecto analgésico.

PALABRAS CLAVES

Vismia baccifera, Guttiferae, toxicidad aguda y actividad analgésica.

ABSTRACT

In the present investigation the analgesic activity and acute toxicity of the *Vismia baccifera* var. *dealbata* (VIB) aqueous extract using experimental animals is being reported. In the acute toxicity assay the medium toxic dose observed was 420 mg/kg where the experimental animals exhibited the lifting up walking as the most representative effect. Mortality was not

observed in any of the doses tested. Significant analgesic activity was observed at 30 min post administration, at the dose of 210 mg/kg for VIB leaves aqueous extract in relation to the control ($p < 0,05$), exhibiting an analgesic effect similar to Acetylsalicylic acid (ASA, reference analgesic) at this time but less than Morphine (opioid reference analgesic). Further investigation is required in order to establish the possible mechanism of this analgesic effect.

KEY WORDS

Vismia baccifera, Guttiferae, sharp toxicity and analgesic activity.

INTRODUCCIÓN

El género *Vismia* pertenece a la Orden Guttiferales, familia Guttiferae (Clusiaceae o Hypericaceae), tribu Vismieae. Este género comprende cerca de 50 especies distribuidas en América y África tropical. La especie *Vismia baccifera* es un árbol de 5 a 12 m de altura, tronco ramificado y corteza externa de color marrón-rojizo, conocida popularmente como lancetillo, carate, pinta mozo, mancha ropa, lacre, sangrito, onotillo, manchador, puntelanza y cedrillo [1]. En Sur América se tienen reportes de tres variedades de esta especie, las cuales se encuentran distribuidas como se describe a continuación: Var. *dealbata* localizada en Surinam, Guyana Francesa, Colombia, Brasil y Venezuela (Estados: Mérida, Táchira, Trujillo, Carabobo, Distrito Federal y Anzoátegui); var. *ferruginea* localizada en Colombia y Venezuela (Estados: Carabobo, Miranda, Amazonas y Ciudad Bolívar) y la var. *subcuneata*

localizada en Perú y Bolivia [1].

Estudios fitoquímicos realizados en especies del género *Vismia* han demostrado la presencia de quinonas, xantonas, antranoides prenilados, lignanos, esteroides, benzofenonas, entre otros [2,3]. De la especie *V. baccifera* se ha aislado la ferruginina A, B y C; la ferrantrona; la vismiona A y B; la vismiaquinona A y C; la diacetilvismona A y la diacetilvismona H [4,5]. En estudios realizados en nuestro laboratorio se aislaron a partir de las hojas de *V. baccifera* var. *dealbata* los compuestos vismiaquinona, friedelina y sesamina, los cuales habían sido reportados en estudios anteriores en otras especies [4,6] sin embargo, es la primera vez que se reportan para la especie en estudio.

Algunas especies de *Vismia* tienen importancia en la medicina tradicional por el látex de color naranja que se desprende al realizar un corte en varias partes de la planta. Este látex ha sido utilizado por algunas tribus del Amazonas para el tratamiento de heridas, herpes y en infecciones por hongos en la piel [7]. Recientemente [8], reportaron la actividad antibacteriana y antifúngica de varios compuestos aislados de la *V. laurentii*, tales como: la vismiaquinona, la friedelina, la bivismiaquinona y vismiaquinona C. Debido a que estas sustancias son comunes en varias especies de *Vismia* [3,5] era de esperarse que el tratamiento de infecciones por hongos y heridas sea efectivo, tal como está reportado en la medicina tradicional del Amazonas [7].

Por otra parte, el efecto citotóxico de varias plantas pertenecientes al género *Vismia* sobre algunas líneas celulares humanas de cáncer ha sido ampliamente estudiado. [5], estudiaron el efecto antiproliferativo del extracto metanólico de *V. baccifera*, observando actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso central. La ferruginina A, B y C; la vismiona B; la diacetilvismona A y la diacetilvismona H; también fueron activas sobre estas líneas celulares. El extracto de raíces de *V. guianensis* ha mostrado citotoxicidad en células de carcinoma oral y adenocarcinoma de colon, asimismo, la vismiona A, un constituyente de esta especie, también ha sido reportado como antineoplásico [4,9]. De las especies *V. japurensis*, *V. reichardtiana* y *V. decipiens* se han aislado otros antranoides prenilados conocidos como vismionas A, B, H, D y F; los cuales poseen actividad citotóxica contra diferentes células tumorales, además de exhibir potente actividad insecticida contra *Lepidoptera larvae* y *Locusta migratoria* [4,10]. Otras especies, tales como *V. jefensis* y *V. macrophylla*, también ejercen actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer de mama, pulmón y sistema nervioso central [5].

La relación entre cáncer e inflamación es bien conocida. La producción de prostaglandinas

proinflamatorias a partir del ácido araquidónico mediante la acción de las ciclooxigenasas, juega un papel importante en el desarrollo de la metástasis y están involucradas en la proliferación de diversos tipos de cáncer [11,12]. Las prostaglandinas de tipo E2 (PGE₂) son mediadoras de la progresión tumoral y además, son las principales moléculas involucradas en el proceso inflamatorio y nociceptivo; más aún, la inhibición de la producción de estas sustancias es el principal mecanismo analgésico de los antiinflamatorios no esteroideos [13,14]. Sin embargo, las distintas especies de *Vismia* que producen actividad citotóxica y antiproliferativa no han sido evaluadas desde el punto de vista de la inflamación y la nocicepción. Cabe destacar que la sesamina, uno de los constituyentes de la *V. baccifera*, ha demostrado inhibición de la producción de prostaglandinas, así como también del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), el cual está involucrado en los mecanismos del dolor y la inflamación [15]. En este trabajo se evaluó la toxicidad aguda, actividad analgésica y actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de las hojas de *Vismia baccifera* (var. *dealbata*) en modelos animales. Dado que hasta la presente no se conocen estudios previos de estas actividades para la especie, estos resultados representan un aporte a la farmacología de la misma.

MATERIALES Y METODOS

Material botánico:

La especie *V. baccifera* var. *dealbata* L. (Triana & Planch.), Guttiferae, fue recolectada en la finca "Los Topes", Aldea San Juanito, Parroquia Chiguará, Municipio Sucre, altura 1250 m.s.n.m., Mérida-Venezuela. Una muestra del material recogido luego de su identificación, fue depositada en el herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (MERF) de la Universidad de Los Andes, bajo el número JR 21.

Obtención del extracto acuoso:

Las hojas (550 g) de *V. baccifera* fueron secadas, molidas y sometidas a extracción continua en un soxhlet durante 3 días usando agua como solvente. Luego de la liofilización se obtuvo 90 g del extracto seco.

Animales de Experimentación:

Para la evaluación de la toxicidad aguda y actividad analgésica se utilizaron 68 ratones de la cepa BALB/c, de sexo masculino, con 15 ± 3 g de peso corporal (todos machos), provenientes del Bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizaron 15 ratas de la cepa Sprague-Dawley (210 ± 24 g)

provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Fármacos usados en los ensayos:

Ácido acetilsalicílico (Bayer, Venezuela; CAS A 3160) y sulfato de morfina (Sigma, USA; CAS M9524), ambos suministrados por la Coordinación del Postgrado de Farmacología de la Universidad Central de Venezuela. La fenilbutazona y la λ -carragenina tipo IV fueron adquiridas en Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de *Vismia baccifera* en ratones.

Para determinar la toxicidad aguda del extracto acuoso de *V. baccifera* (VIB) en ratones, se utilizó el método observacional descrito por [16,17] (Campbell y Ritcher, 1967). La dosis tóxica media (DT₅₀) fue determinada por el método de [18]. Los animales de experimentación se dividieron en 6 grupos de 8 ratones cada uno (n=8). Todos los grupos, con excepción del grupo control, se trataron con una dosis del extracto acuoso de las hojas de VIB, siguiendo el esquema que se presenta a continuación:

Grupo A: 8 mg/kg intraperitoneal (i.p.); Grupo B: 32 mg/kg (i.p.); Grupo C: 128 mg/kg (i.p.); Grupo D: 512 mg/kg (i.p.); Grupo E: 1024 mg/kg (i.p.) y Grupo F: Control, NaCl 0,9% i.p. (volumen requisito). Una vez administradas el extracto, los ratones se observaron y analizaron a los 10, 30, 60 y 90 minutos, registrándose el signo tóxico más representativo. La DT₅₀ se determinó mediante la construcción de una curva dosis-efecto tóxico y el empleo de nomogramas probabilísticos.

Evaluación de la Actividad Analgésica del extracto acuoso de *Vismia baccifera* en ratones.

Para determinar la actividad analgésica se aplicó un estímulo térmico doloroso en la cola de los ratones y se cuantificó el tiempo que tarda el animal en retirar la cola (tiempo de reacción) [19]. Los animales se distribuyeron en 4 grupos de 5 animales cada uno y se pre-trataron como sigue: Grupo A: control, (NaCl 0,9% i.p.); Grupo B: sulfato de morfina, 3 mg/kg (i.p.); Grupo C: ácido acetilsalicílico (ASA), 20 mg/kg p.o. (en carboximetilcelulosa al 2%) y Grupo D: VIB, 210 mg/kg (1/2 DT₅₀). El ASA y la morfina se utilizaron como analgésicos de referencia. Los ratones se sometieron a un estímulo térmico en una pequeña área de la cola mediante un analgesímetro (LETICA, Scientific Instruments, LE 7106, España), el cual mide el tiempo que transcurre entre la aplicación del estímulo de luz radiante hasta que el animal retira la cola. El tiempo que tarda el animal en retirar la cola se considera el tiempo de reacción (latencia). Este período de latencia fue medido

a los 15, 30, 60, y 90 segundos después de la administración de los tratamientos. El tiempo máximo de reacción fue de 15 segundos. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar del promedio ($\bar{x} \pm eem$). Las diferencias se calcularon por el método de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía y por la prueba de Dunnett. Valores de *p* menores que 0,05 (*p*<0,05) fueron considerados significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso de las hojas de *V. baccifera* var. *dealbata*, se estableció el signo de caminata en alzada como efecto tóxico más representativo [16], el cual ocurrió a partir de la dosis de 32 mg/kg de VIB (2 ratones de 8), observándose un 100 % del efecto tóxico en los animales (8 de 8 ratones), con la dosis de 1024 mg/kg. En la tabla 1 se observa el número de ratones que presentaron el efecto tóxico de caminata en alzada a las diferentes dosis y tiempos (10, 30, 60 y 90 min.) ensayados. La caminata en alzada pertenece a los signos de incoordinación motora, por lo que es considerada como marcha anormal en animales de experimentación [16]. El efecto pico se observó a los 30 minutos (Fig. 1). La DT₅₀ de VIB fue de 420 mg/kg con límites fiduciaros de 172,3 a 506,1 mg/kg, calculados por el método de [18]. No se observó letalidad en ninguna de las dosis ensayadas, lo que indica buena seguridad para el uso de este extracto en otras pruebas *in vivo*.

TABLA 1

Animales con manifestación tóxica inducida por el extracto acuoso de *Vismia baccifera*.

Extracto acuoso de <i>V. baccifera</i> (mg/kg)	N° de ratones**			
	10*	30*	60*	90*
08	0	0	0	0
32	0	2	2	1
128	2	3	2	2
512	3	6	4	4
1024	6	8	7	5

*Tiempo tomado en minutos

** Número de ratones que presentaron el signo de caminata en Alzada

Por otro lado, a pesar de la presencia de la sesamina en el extracto, éste no fue capaz de inhibir el desarrollo del edema de la pata de la rata inducido por la λ -carragenina. Cabe destacar que la sesamina, al igual que otros lignanos, es constituyente de algunas plantas con propiedades antiinflamatorias y analgésicas [15]. Sin embargo, es necesario evaluar otras dosis y otras vías de administración de VIB para

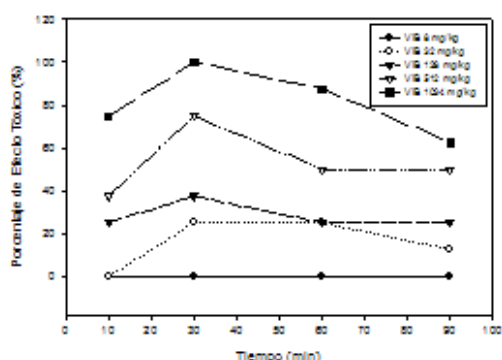


Fig. 1 Efecto Tóxico del extracto crudo de *V. baccifera* L. (VIB) en ratones.

llegar a resultados más concluyentes. Existen evidencias que señalan a la sesamina como un compuesto antioxidante que inhibe la producción de PGE2 y de citoquinas [15,20]. Asimismo, se le atribuye la disminución del ácido araquidónico (precursor de eicosanoides pro-inflamatorios) debido al aumento y acumulación del ácido dihomo- λ -linolénico, resultante de la inhibición de la Δ^5 -desaturación de los ácidos grasos de seis átomos de carbono [21,22]. Por lo que se espera, que las plantas que contienen este lignano, exhiban efecto antiinflamatorio y/o analgésico.

En contraste, el extracto de *V. baccifera* produjo una moderada actividad analgésica a los treinta minutos post-tratamiento con respecto al control ($p < 0,05$). Mostrando un efecto analgésico similar al ASA, pero diferente a la morfina (Figura 2). Lo cual tomando en cuenta la disminución de la producción de prostaglandinas por la sesamina [15], se especula que el extracto produzca el efecto antinociceptivo por esta misma vía.

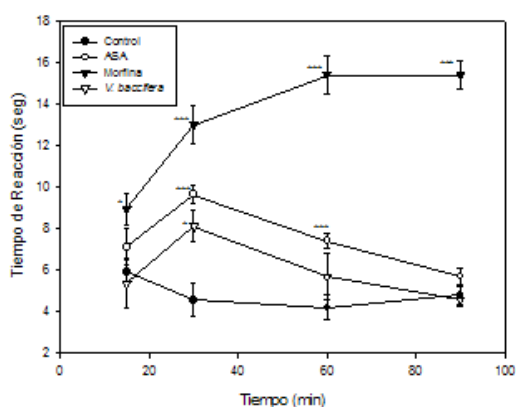


Fig. 2 Actividad analgésica de *V. baccifera* L. (VIB) en ratones.

CONCLUSIONES

En el ensayo de toxicidad aguda se determinó una DT_{50} de 420 mg/kg, exhibiendo los animales de

experimentación el signo de caminata en alzada como el efecto tóxico más representativo, no observándose letalidad en ninguna de las dosis ensayadas, lo que da un margen de seguridad aceptable para el uso de éste extracto en otras pruebas *in vivo*. El extracto de VIB mostró actividad analgésica moderada a la dosis de 210 mg/kg, sin embargo la dosis de 80 mg/kg falló en producir un efecto antiinflamatorio en el modelo de edema de la pata de la rata inducido por λ -carragenina. Este resultado abre la posibilidad de ensayar dosis mayores del extracto y evaluar sus constituyentes, en especial la sesamina, en varios modelos de inflamación y nocicepción. Así como también estudiar el efecto del extracto de VIB en la producción de prostanoïdes y citoquinas tanto *in vivo* como *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Fondo Nacional de Ciencia, Investigación y Tecnología (Fonacit), por su aporte económico a través del contrato número 00001548. Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT), de la Universidad de los Andes, por el financiamiento a través del proyecto código FA-3070-308-Em.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Ewan, J. 1962. The South American Species of *Vismia* (Guttiferae). U.S. Nat. Museum, Contribution from the National Herbarium. 35 (5): 293.
- 2.- Nagem, T., Alves, V. 1995. Constituents of *Vismia Magnoliaefolia*. *Fitoterapia*. 56 (3): 278-280.
- 3.- Nagem, T., D' Oliveira, F. 1997. Xanthones and Other Constituents of *Vismia parviflora*. *J. Braz. Chem. Soc.* 8 (5): 505-508.
- 4.- Delle Monache, F. 1985. Chemistry and Biological activity of the secondary metabolites of *Vismieae*. *Rev Latinoam Quím.* 16 (1): 5-15.
- 5.- Hussein, A., Bozzi, B., Correa, M., Capson, T., Kursar, T., Coley, P., Solis, P., Gupta, M. 2003. Bioactive Constituents from Three *Vismia species*. *J. Nat. Prod.* 66 (6): 858-860.
- 6.- Camele, G., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Marini Bettolo, G., De Lima. 1982 A. 2- Isoprenylemodin and 5,5'- Dimethoxysesamin from *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry*. 21 (2): 417-419.
- 7.- Pasqua, G., Monacelli, B., Cuteri, A., Spuntarelli, F., Rascio, N., Botta, B., Delle Monache, G, Scurria, R., 1995. Accumulation of Vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis*. *Protoplasma*. 189: 9-16.
- 8.- Kuete, V., Nguemaving, J., Penlap, V., Blaise,

- A., Etoa, F., Meyer, M., Bodo, B., Ephrem, A. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *J. Ethnopharmacol.* 109: 372-379
- 9.- Suffredini, I., Paciência, M., Varella, A., Younes, R. 2007. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia.* 78: 223-226.
- 10.- Cassinelli, G., Geroni, C. 1986. Cytotoxic and antitumor activity of Vismiones isolated from *Vismieae*. *J. Nat. Prod.* 49 (5): 929-931.
- 11.- Balkwill, F., Coussens, L. 2004. Cancer: an inflammatory link. *Nature.* 431: 405-406.
- 12.- Fulton, A., Ma, K., Kundu, N. 2006. Targeting Prostaglandin E EP Receptors to Inhibit Metastasis. *Cancer Res.* 66 (20): 9794-9797.
- 13.- Zeilhofer H. 2007. Prostanoids in nociception and pain. *Biochem. Pharmac.* 73 (2): 165-174.
- 14.- Wang, M., Honn, K., Nie, D. 2007. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 26 (3-4): 525-34.
- 15.- Utsunomiya, T., Chavali, S., Zhong, W., Forse, R. 2000. Effects of sesamin-supplemented dietary fat emulsions on the ex vivo production of lipopolysaccharide-induced prostanoids and tumor necrosis factor alpha in rats. *Am J Clin Nutr.* 72 (3): 804-8.
- 16.- Irwin, S. 1962. Drug screening and evaluative procedures. *Science.* 136: 123-128.
- 17.- Campbell, D., Richter, W. 1967. An observational method estimating toxicity and drug actions in mice applied to 68 reference drugs. *Pharmacol Toxicol.* 25: 345-363.
- 18.- Litchfield, J., Wilcoxon, F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113.
- 19.- Davies, O., Raventos, J., Walpole, L. 1946. A method for the evaluation of analgesic activity using rats. *Brit. J. Pharmacol.* 1: 255.
- 20.- Jeng, K., Hou, R., Wang, J., Ping, L. 2005. Sesamin inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production by suppression of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *Immunol Lett.* 97(1):101-6.
- 21.- Fujiyama-Fujiwara, Y., Umeda-Swada, R., Kuzuyama, M., Igarashi, O. 1995. Effects of sesamin on the fatty acid composition of the liver of rats fed n₆ and n₃ fatty acid-rich diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo).* 41: 217-25.
- 22.- Chavali, S., Zhong, W., Forse, R. 1998. Dietary alpha-linolenic acid increases TNF-alpha, and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS: effects of sesamin on the delta-5 desaturation of omega6 and omega3 fatty acids in mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 58 (3):185-91.