

Uso etnobotánico y estudio de toxicidad aguda del extracto de corteza *Angostura trifoliata* (willd) T.S. Elias

Yenys M. Gimón¹, Beatriz H. Guevara^{1*}, Trina Collman²

¹Unidad Neurofarmacología y Farmacología Clínica, Cátedra de Farmacología, Facultad Farmacia, UCV. ²Unidad de Modelado Molecular, Facultad Farmacia, UCV.

Correo electrónico: *beatrizhguevara@gmail.com Telf 02126052711.

RESUMEN La corteza de *Angostura trifoliata* (Willd.) T.S. Rutaceae, se ha utilizado con fines

terapéuticos en Venezuela. **Objetivo:** Determinar el uso etnobotánico de esta planta y estudiar sus efectos tóxicos. **Metodología:** Utilizando un protocolo, validado previamente en sector La Florida, Anaco; se realizó estudio descriptivo, analítico, transversal en muestra de 76 usuarios de la corteza de esta planta, en mercados populares de: Anaco, Mérida y Bolívar, a personas mayores de 18 años. Para evaluar toxicidad aguda, se obtuvo el extracto por Soxhlet, se administro ip., (100 – 850 mg/ kg) a ratones machos INH, según Litchfield y Wilcoxon e Irvin para determinar DL₅₀, DT₅₀ y efectos tóxicos asociados. **Resultados:** Usos etnobotánicos: Diabetes mellitus tipo 2 (56%), malaria (26%) y reducción de peso (18%). Tiempo de administración: 3 meses. Forma de preparación casera: a) cocido o macerado en agua (64 %) y b) mezcla de etanol: agua (36 %). Administración: oral; frecuencia: cada 12 h (46%), sustituto del agua diaria (29%), una vez al día (25%). Efectos tóxicos: Hiperglicemia, convulsiones, incoordinación motora, sedación, dificultad respiratoria, prurito, ptosis parpebral, parálisis espástica. DL₅₀: a) diluido en agua: 452 mg/kg y b) etanol: agua 352 mg/kg, asociadas a convulsiones. DT₅₀: a) diluido en agua 192 mg/kg y b) etanol: agua 162 mg/kg; efecto: incoordinación motora. **Conclusiones:** 1. Uso actual: diabetes tipo 2, malaria y control de peso, 2. Toxicidad asociada a convulsiones, mayor en la mezcla hidroalcohólica y 3. Población usuaria en riesgo por alteraciones neurológicas y metabólicas (hiperglicemia) que podría llevar a la muerte.

Palabras clave: alcalioides, etnobotánico, tóxicos, etanol macerado, corteza de angostura.

Introducción y objetivos

Venezuela no escapa del uso de plantas en medicina tradicional como alternativa terapéutica. La *Angostura trifoliata* (Willd.) T.S. Elias, (nombre original *Bomplandia trifoliata* Willd) de la familia de las Rutaceae, del género *Angostura* ha sido usada por la tribu de los Indios Cusparias (Hokche, 2008). El uso actual de esta planta no está determinado; sin embargo, estudios previos indican que se utilizaba para el tratamiento del *Mycobacterium tuberculosis* en el antiguo y nuevo mundo en 1900 (Houghton y col., 1999). Estudios fitoquímicos han demostrado que en su corteza se encuentran alcaloides activos contra este mi-

croorganismo y la malaria (Fernández y col, 2007; Collet y col., 2000; Houghton y col., 1999).

En Venezuela, esta planta se localiza en los Estados: Delta Amacuro (Sierra de Imataca), Bolívar (Ciudad Bolívar, en las adyacencias del Lago Hurí, río Caroni, río Caura, río Cuyuní, Sierra de Imataca, Upata), Amazonas, específicamente en el alto Orinoco (Steyermark y col., 2005), Anzoátegui y Sucre (Hokche, Berry y Huber, 2008) y en el Llano hasta el pic de los Andes (Lindorf, 2001). Se describe como un árbol de 20 mts de altura, de hojas trilobuladas, flores campanuladas blancas y corteza pardo-amarillenta, conocida como quina de Guayana, quina de Nueva Andalucía, *Angostura verdadera*, cusparea, cascarillo, quina, quina blanca, quina amarilla, cuspa, cusparea y pertenece a un género que no contiene quinina (Uphof, 1968).

En Latinoamérica ha sido utilizada para el tratamiento de la malaria, dispepsia, falta de apetito, gastritis, insuficiencia respiratoria, tuberculosis y tratamiento de la diabetes tipo II (Gupta, 1995). En Europa se ha empleado como antipirético, antimalárico, digestivo, disentería, diarreas crónicas y *tuberculosis* (Houghton y col., 1999). Dosis altas se asocian a la aparición de efectos secundarios relacionados a emesis, diarrea y cefalea. (Rodríguez, 1985). Los indígenas sudamericanos emplean para intoxicar peces y recogerlos al subir a la superficie (Steyermark y col, 2005). Dado el amplio uso de plantas en la actualidad, se realizó esta investigación con el objetivo de determinar el uso etnobotánico actual y forma de preparación del extracto de la corteza de *Angostura trifoliata* (willd.) T.S. Elias (Rutaceae) (extracto AT) en usuarios de esta planta que adquieren la corteza en mercados populares de Anaco, Ciudad Bolívar y Mérida, así como, estudiar su toxicidad aguda en ratones.

Materiales y métodos

Evaluación del uso actual del extracto AT en mercados populares

Utilizando un protocolo, validado en el sector La Florida, Anaco; se realizó un estudio descriptivo, analítico, transversal en una muestra de 76 usuarios (ambos géneros, mayores de 18 años) de compradores la corteza de *Angostura trifoliata* (willd.) T.S. Elias (Rutaceae) (corteza AT) de plantas medicinales, en mercados populares de Anaco, Mérida y Ciudad Bolívar.

Determinación de la letalidad y toxicidad del extracto AT en ratones.

Las cortezas de AT se compraron en el mercado principal de Mérida (Venezuela) en Febrero de 2009. El proveedor indicó que el material vegetal fue recolectado en el río Cuyuni, Sierra de Imataca Estado Bolívar, suministró hojas y flores de la planta. La identificación botánica fue realizada en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Se dejó una muestra de referencia bajo el código de registro MYF 20936.

La corteza en referencia se desecó a temperatura ambiente. Una vez molido y sometido a extracción continua en la cámara de Soxlet con etanol al 95% por 48 h a 80 °C, se obtuvo el extracto, el cual se filtró, y

concentró a presión reducida para obtener el extracto AT, mantenido en frasco ámbar herméticamente cerrado para evitar su descomposición química y contaminación. Para su reconstitución se usó agua destilada y una mezcla de etanol: agua (0,1: 0,9). El estudio de toxicidad se realizó en ratones albinos macho cepa INH, procedentes del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (Caracas) de cuatro semanas de edad con un peso entre 20 y 25 g, alimentados con Ratarina* *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos libres en jaulas, con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Su permanencia mínima en el laboratorio antes de administrar el extracto AT fue de 3 días. Se aplicó el método descrito por Litchfield y Wilcoxon (1948), a fin de determinar la dosis de extracto AT administrado ip, capaz de provocar el efecto tóxico (DT₅₀) o la muerte (DL₅₀) en el cincuenta por ciento de los animales de experimentación para determinar la dosis tóxica y letal 50. Para analizar los efectos tóxicos, se registraron y detallaron los videos obtenidos con una cámara (Handycam- Sony- Modelo Dcr-DVD508). Las alteraciones conductuales fueron comparadas con el grupo control entre 0-30, 30-60, 60-90 min. Las observaciones permitieron detallar signos de toxicidad relacionados a efectos inhibitorios (sedación, caída del tren posterior (CTP), incoordinación motora y ptosis palpebral) ó excitatorios (convulsiones) y alteraciones conductuales incluyendo su inicio y duración. Los animales fueron sacrificados siguiendo los lineamientos bioéticos establecidos por el FONACIT, 2002.

Determinación del evento convulsivo en dosis letales y alteraciones de la glicemia producidas por el extracto de AT

Algunas convulsiones, como las producidas por bicuculina cursan con hiperglicemia (Lang, 1995). Algunos autores tales como: García, García y Matías (2009); Nehlig, Dube y Koning (2002) definen el estatus convulsivo tónico clónico como: aquellas crisis que duran más de 30 min, dos o más crisis sin recuperación del nivel de conciencia o cuando las crisis son seguidas y aquellas que no ceden en 5 min, caracterizadas por una prolongación de la duración de la convulsión con reducción o sin modificación del periodo interictal entre las convulsiones. A fin de evaluar si el evento convulsivo estaba asociado a la aparición de hiperglicemia, se les retiró el alimento 2 h antes de la experimentación,

para tener niveles glicemia iniciales homogéneos. Se realizó una segunda medición justo antes de presentarse la convulsión, para lo cual se determinó los signos característicos que indicaban el inicio de la convulsión (presencia de movimiento anormal). La muestra de sangre fue tomada por venopunción de la cola y se registró la glicemia usando el sistema comercial Ascencia Entrust (Bayer).

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media a un 95% de confianza. Se sometieron análisis de varianza (ANOVA) con posterior prueba de t-student de 2 colas. La determinación de la DL_{50} y DT_{50} se realizó siguiendo el método de Litchfield y Wilcoxon adaptado a un programa computacional. Se utilizó el programa Graph PadPrism versión 5.0. Diferencias significativas entre los grupos $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Determinación del uso actual de la corteza AT en mercados populares

La figura 1A nos indica que los usuarios compradores de la corteza AT la usan para el tratamiento de la diabetes tipo II (56 %), malaria (26 %) y control o reducción de peso corporal (18 %). En cuanto a la forma de preparación, ver figura 1B, principalmente utilizan maceración o cocción con agua en un 64% de los usuarios y maceración en una mezcla hidroalcohólica (etanol: agua) en un 36%. La figura 1C, brinda información sobre la frecuencia de uso diaria: extractos AT ingeridos cada 12 horas (48%) de los usuarios, diariamente en un 25% y sustitución del agua diaria por el consumo de este extracto (27%) de los usuarios, quienes pueden ingerir hasta más de 8 vasos al día.

En la figura 2, se muestra la preferencia de uso diario del extracto AT: Sustitución por agua (figura 2A), una vez al día (figura 2B) y dos veces al día (figura 2C) de los extractos obtenidos por maceración con agua o con etanol: agua, según el género y la edad. La preferencia de sustitución por el agua fue mayor en el género masculino entre 26 y 50 años (figura 2A). La ingestión del extracto una vez al día es indistintamente usado según el género y pareciera ser más frecuente en mayores de 60 años en el género masculino (figura 2B). La preferencia de uso cada 12 h (dos veces al día) es mayor en las mujeres con edades comprendidas

entre 18 y 25 años (figura 2C), quienes manifestaron usar el extracto para el control de peso.

Determinación de letalidad: Dosis letal cincuenta (DL_{50}) del extracto AT en ratones

La causa asociada a la muerte de los ratones tratados con el extracto de AT fue la aparición de convulsiones de tipo tónico clónica. La DL_{50} de animales tratados con el extracto restituído en mezcla de etanol: agua (0,1: 0,9) fue de 354 mg/kg, mientras que la reconstitución con agua fue de 452 mg/kg. La figura 3, muestra que la curva dosis respuesta se desplaza hacia la izquierda cuando se administra el extracto hidroalcohólico, ($p < 0,05$) utilizando la prueba estadística de Wilcoxon.

Determinación de toxicidad: Dosis tóxica cincuenta (DT_{50}) del extracto AT en ratones

La dosis que produjo el 100% de los efectos tóxicos (DT_{100}) sin muerte en los animales fue diferente en vehículo hidroalcohólico 200 mg/kg respecto al restituído en agua que fue de 250 mg/kg. El efecto tóxico presente en el 50 % de los animales sometidos a experimentación con mayor reproducibilidad fue la incoordinación motora. Cuando el extracto de AT se reconstituyó en la mezcla hidroalcohólica, la DT_{50} fue de 162 mg/kg a diferencia de lo que ocurrió cuando el extracto se restituuyó en agua ($DT_{50} = 192$ mg/kg) La Figura 4 muestra que la curva dosis respuesta del extracto AT en vehículo hidroalcohólico sigue desplazada hacia la izquierda respecto al vehículo acuoso ($p < 0,05$), lo cual muestra que el alcohol presente potencia la toxicidad.

Otros efectos tóxicos relevantes se muestran en la Figura 5A y 5B, entre ellos: prurito, piloerección, ptosis palpebral, sedación, CTP, dificultad respiratoria y parálisis espástica. Los animales tratados con el extracto AT hidroalcohólico presentaron efectos tóxicos más persistentes que los observados en los animales con el extracto AT restituído en agua. Ambos grupos, presentaron prurito (Figura 5A y 5B). Gama y col., 2009 proponen que el prurito se produce cuando los terminales nerviosos localizados en piel son estimulados por liberación de histamina y prostaglandinas, con la consecuente activación de la vía hacia la médula espinal y posterior proyección al SNC, especí-

ficamente al lóbulo parietal inferior y a la corteza cingulata anterior, siendo estas últimas las áreas responsables de las respuestas nociceptivas que originan los movimientos como respuesta a estas sensaciones (Darsow y col., 2000). Es posible que el extracto en estudio, produzca prurito por un efecto histamino o prostaglandino similar.

Otro efecto predominante fue la piloerección a dosis mayores a 150 mg/kg (Figura 5A y 5B). Este efecto tóxico se ha reportado posterior a la administración de extractos que presentan actividad catecolaminérgica y neurotóxica (Cambar y col., 1983) y se ha asociado a la administración de dobutamina como un efecto adverso, asociado a la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos (Vidal, 2009). La ptosis palpebral se evidenció en el 50% de los animales a la dosis de 200 mg/kg del extracto AT hidroalcohólico y disminuye a 37% cuando el extracto se diluyó en agua. No se produjo este efecto a 150 mg/kg del extracto AT en agua.

La sedación se evidenció a la DT_{100} independientemente del vehículo utilizado. A dosis 120 mg/kg del extracto AT hidroalcohólico, se evidenció este efecto tóxico en un 12,5% de los animales; sin embargo, este no estuvo presente cuando el extracto se restituyó en agua. La CTP a dosis inferiores de 180 mg/kg se produjo en un 37,5% de los animales tratados con extracto en vehículo hidroalcohólico, a diferencia del extracto restituido en agua, donde no se evidenció este efecto. La dificultad respiratoria y la parálisis espástica se produjo en un 12,5% cuando el extracto se administró en mezcla hidroalcohólica a dosis por debajo de 200 mg/kg y no se produjo al ser reconstituirse en agua.

Asociación entre evento convulsivo en dosis letales y alteraciones de la glicemia inducidas por el extracto AT

La figura 6 relaciona la aparición de convulsiones de tipo tónico clónicas 14 segundos después de administrar del extracto AT en dosis ≥ 400 mg/kg. El número de convulsiones dependió de la dosis pero no del vehículo utilizado ($p > 0,05$). Las convulsiones se asociaron a temblor, brincos y cola de Straub con patrón de estatus convulsivo (más de tres convulsiones), sin periodo de recuperación entre cada una de las convulsiones como las reportadas por García, Garcías y Matías, 2009; Nehlig, Dube y Koning, 2002.

Las convulsiones se asociaron a la muerte y también cursaron con hiperglicemia a dosis menores a la DL_{50} en los animales tratados con el extracto AT diluido en agua ($p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Lang, 1995 quien encontró que el estatus convulsivo producido la bicuculina precedía de hiperglicemia debido un aumento rápido de la producción de glucosa hepática, por incremento en la glucogénesis y glucogenolisis a partir del glucogeno hepático (Lang, 1994). Además, el efecto hiperglicémico que produce la bicuculina también es directamente proporcional a la dosis convulsiva (Narita, Nishihara y Takahashi 1994; Nonogaki, Iguchi y Sakamoto, 1998) tal como muestran nuestros resultados al administrar el extracto AT. El mecanismo proconvulsivante de la bicuculina se debe al antagonismo competitivo sobre los receptores $GABA_A$. Este efecto toxicodinámico evita que el neurotransmisor $GABA_A$ ejerza su acción inhibitoria, con la consecuente prolongación del potencial de acción del ión calcio y bloqueo los canales de potasio, asociado a la aparición de convulsiones (Velisek, 2009; Nowak, 1982; Slimmonds, 1980; Johnston, 1978).

Conclusiones

El uso etnobotánico del extracto AT en usuarios habitantes de Anaco, Ciudad Bolívar y Mérida se emplea para el control de la: Diabetes tipo 2, malaria y reducción de peso en personas de cualquier género mayores de 18 años.

Los estudio de toxicidad aguda en animales indican que la DL_{50} y la DT_{50} del extracto AT restituido en la mezcla hidroalcohólica es menor que el diluido en agua, lo que sugiere que el etanol potencia sus efectos tóxicos. La letalidad se asocia a convulsiones tónico clónicas e hiperglicemia, lo cual descarta un posible efecto beneficioso en el tratamiento de la diabetes tipo II.

Dado que un 29% de los usuarios sustituyen el agua potable de uso diario por consumo del extracto, y que existe la posibilidad que ingieran más de 8 vasos al día, se sugiere continuar este tipo de investigación a fin de determinar el margen de seguridad por administración oral de esta corteza y de ser necesario, educar a la comunidad en relación a los riesgos que pudiesen estar asociados al uso por automedicación de este tipo de plantas medicinales.

Referencias bibliográficas

- Cambar, P., Tabora, E., Fiallos, C., Alvarado, C., Casco, E., Raudales, V., Vinelli, E y Lopez, C 1983. Efectos Neurofarmacológicos de los extractos acuosos de hojas de *Synsepalum Dulcificum* en ratones. *Rev Medica Hondur* 5(54): 85-92
- Collet I, Jacquemond, Hannedouche S, Fouraste I., Moulis C. 2000 Novel quinoline alkaloid from trunk bark of *Galipea officinali*. *Fitoterapia* 71: 605- 606.
- Darsow U, Drzezga AM, Frisch M, Munz F, Weilke F, Bartenstein P, Schwaiger M, Ring J. (2000) Processing of histamine-induced itch in the human cerebral cortex: A correlation analysis with dermal reactions. *J Invest Dermatol.* (115):1029-1033.
- Fernández M, Soares M, Batista J, Vieria P. 2007. Alkyl, Aryl, Alkylarylquinoline, and related alkaloids related alkaloids *Alkaloids Chem Biol.* 4 (64): 139-214.
- Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2002. Código de Bioética y Bioseguridad Segunda Edición, Cap. 2. Caracas. Ministerio de Ciencia y Tecnología
- Gama H, Aldo I, Sioi F, Matola A, Barros H, Lunet N (2009) Factors associated with chloroquine induced pruritus during malaria treatment in Mozambican University students. *Gac Sanit.* 23 (4): 306-310
- Garcia M, Garcia M, Matías M 2009. Modelos experimentales en Epilepsia *Neurología.* 25(3):181-188
- Gupta M. 1995. Plantas Medicinales Iberoamericanas. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo "Cyted". Subprograma de química fina farmacéutica; Convenio Andrés Bello. Primera edición. Santa Fe, Bogotá- Colombia: 617.
- Houghton PJ, Woldemariam TZ, Watanabe Y, Yates M. 1999. Activity against *Mycobacterium tuberculosis* of alkaloid constituents of *Angostura* bark, *Galipea officinalis*. *Plant Med.* 65(3):250-254.
- Hokche O, Berry P.F y Huber O. 2008. Catalogo de la Flora Vasculare de Venezuela. Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobias Lasser Caracas. 859.
- Irwin, S. 1964. Animal and Clinical Pharmacology Techniques. In *Drug Evaluation*. Cap. 4: Drug Screening and Evaluation of New Compounds in Animals. *Year Book Medical Publishers, Inc USA*: 36-53
- Johnston G. 1978. Neuropharmacology of amino acid inhibitory transmitters. *Ann Rev. Pharmacol. Toxicol.* 18: 269-289.
- Lang CH. 1995. Inhibition of Central GABA_A Receptors Enhances Hepatic Glucose Production and Peripheral Glucose Uptake. *Brain Res Bull.* 37 (6): 611-616
- Lang CH. 1994. Inhibition of central GABA_A receptors enhances hepatic glucose production and peripheral glucose uptake. *J Neuroendocrin.* 6(4):443-446.
- Litchfield J and Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiment, *J Pharmacol.* 96: 99-115.
- Narita K, Nishihara M, Takahashi M 1994. Concomitant regulation of running activity and metabolic change by the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 642:290- 296
- Nehlig A, Dube', Cé, Koning E 2002. Status epilepticus induced by lithium-pilocarpine in the immature rat does not change the long-term susceptibility to seizures. *Epilepsy Res.* 51: 189 - 197
- Nonogaki K, Iguchi A, Sakamoto N 1998. Bicuculline methiodide influences the central nervous system to produce hyperglycemia in rats. *J Neuroendocrinol.* 6:443-446.
- Nowak M, Young A and McDonald R. 1982. GABA and bicuculline actions on mouse spinal cord and cortical neurons in cell culture. *Brain Res.* 244: 155-164.
- Rodríguez P. 1985. Árbol de América del Sur. En *Venezuela en Guayana y zonas adyacentes*. Editorial Avila: 72.
- Steyermark J, Berry P, Yatskiyevych K, and Holst B. 2005. Flora of the Venezuelan Guayana. Editorial Missouri Botanical Garden Press. 9: 6-7.
- Uphof, J.C.Th. 1968. *Dictionary of economic plants*. 2ª ed. Cramer, Editorial, Lehre.
- Velisek L. 2009. Models of Generalized Seizures in Freely Moving Animals. Elsevier: 775- 780
- Vidal I. 2009. Piloerección como efecto colateral de la dobutamina. *Arq Bras Cardiol* 92(4): 283-285.

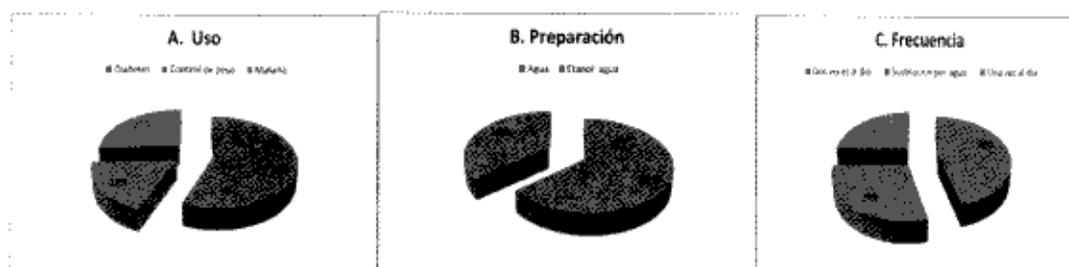


Figura 1 A. Usos B. Preparación y C. Frecuencia de administración del extracto acuoso ó hidroalcoholico de la corteza AT usuarios de Anaco, Ciudad Bolívar y Mérida.

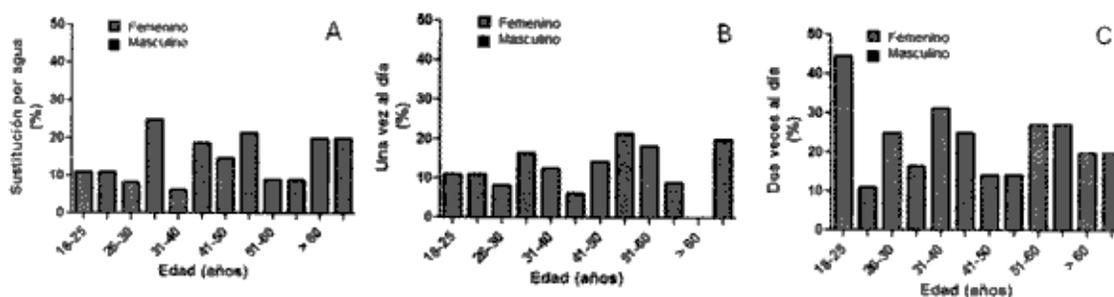


Figura 2. Preferencia de uso del extracto AT según el género y la edad. A. Sustitución por agua, B. Una vez al día y C. Cada 12 horas. Barras rosadas (sexo femenino) Barras verdes (sexo masculino).

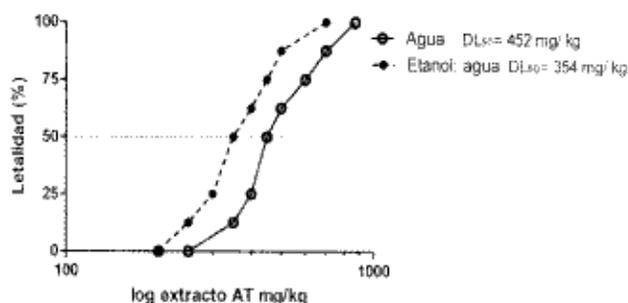


Figura 3 Curva dosis respuesta de letalidad producida por extracto de AT. Línea segmentada: % de letalidad del extracto AT restituido en etanol: agua. Línea continua: % de letalidad del extracto AT reconstituido en agua. $p < 0,05$

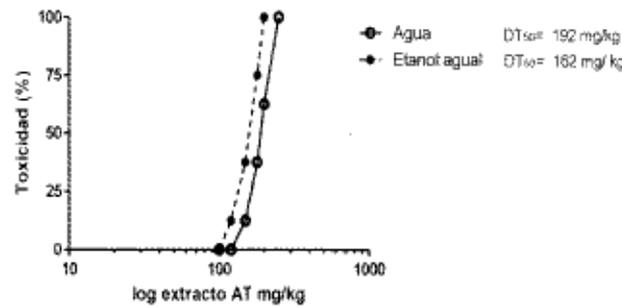


Figura 4. Curva dosis respuesta de toxicidad del extracto AT (mg/kg). Línea segmentada: % de toxicidad del extracto AT reconstituido en etanol: agua (0,1:0,9). Línea continua: % de toxicidad del extracto AT reconstituido en agua. ($p < 0,05$)

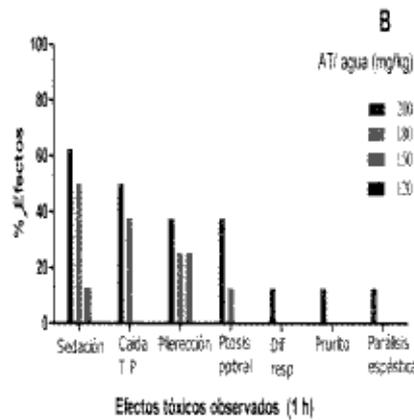


Figura 5. Efectos tóxicos producidos con dosis aguda del extracto AT en estudio de toxicidad aguda. Extracto AT: A reconstituido en etanol: (agua 0,1: 0,9); B (reconstituida en agua).

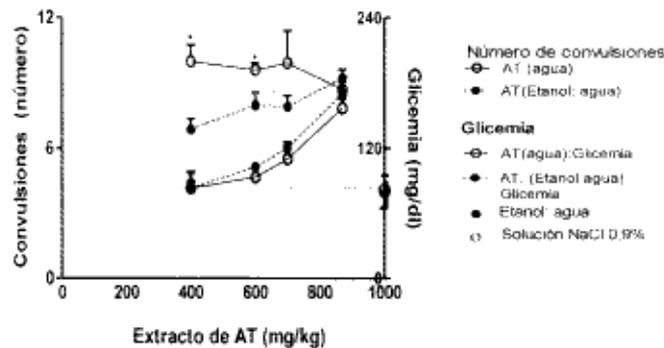


Figura 6. Asociación entre convulsiones tónico clónicas e hiperglicemia producidas por extracto AT en ratones. Numero de convulsiones: AT diluido: en agua (—○—); en etanol: agua (....●....) ($p > 0,05$). Glicemia: AT diluido en: agua (—○—); etanol: agua (....●....) ($p < 0,05$). Grupo control Etanol: agua (—○—), NaCl 0,9% (....●....)