

ESTUDIO FITOQUIMICO Y FARMACOLOGICO DEL "SENECIO FORMOSUS"

Resumen del trabajo de tesis, presentado por FLOR CECILIA MUÑOZ QUEVEDO, para optar al título de Químico-Farmacéutico.

Presidente de tesis: Doctor JORGE OLARTE C.

Trabajo realizado en los laboratorios de fitoquímica y farmacología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y en el laboratorio de investigaciones médicas veterinarias del ICA.

INTRODUCCION

En la medicina popular es muy común el uso de las plantas como un medio para el tratamiento de las enfermedades, y en la mayoría de los casos se desconoce aún el fundamento científico de su acción. Por este motivo y copatrocinado por Colciencias, se está llevando a cabo el plan de trabajo titulado "estudio científico de la actividad medicamentosa y de los principios activos de las plantas de la flora colombiana, usualmente empleados como medicinales", del cual hace parte el presente estudio.

Algunas de las plantas empleadas como medicinales tienen graves efectos colaterales, tal es el caso del Senecio formosus, conocido comúnmente como Arnica colombiana, que ha sido usado en la medicina popular, en infusiones, tinturas y cataplasmas para el tratamiento de hemorragias y externamente para contusiones.

El Arnica antes que producir efecto medicinal alguno, causa una mortal enfermedad: la enfermedad veno-oclusiva hepática, que en su fase crónica y final es difícil de diferenciar de una cirrosis, ocurriendo la muerte en la mayoría de los casos por coma hepático.

Dado el hábito tan común en nuestras gentes de ingerir bebidas medicinales a base de Arnica, y por el hecho de que se siguen presentando casos de intoxicación y muerte de las personas que las consumen, así como también intoxicación de los animales de pastoreo en las regiones donde se encuentra esta planta, se consideró de importancia realizar este trabajo cuyo objetivo es adelantar un estudio fitoquímico y farmacológico del *Senecio formosus*. Mediante el estudio fitoquímico se pretende determinar la naturaleza de las sustancias que posee esta planta así como aislar los grupos de componentes más importantes.

El estudio farmacológico mediante la experimentación en pequeños animales de laboratorio tiene por objeto hallar el tipo de sustancias responsables de la toxicidad de la planta por la administración a ratones de los extractos de las hojas completas, de las hojas desengrasadas y de los alcaloides totales presentes en ellas. Además de esto se pretende determinar la naturaleza de las lesiones producidas en el hígado y los cambios que se pueden presentar en otros órganos por administración oral e intraperitoneal.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. En el presente estudio se trabajó con el *Senecio formosus* H. B. K.

El material vegetal objeto de este trabajo fue clasificado por el doctor Hernando García Barriga y el correspondiente ejemplar figura en el Herbario Nacional Colombiano bajo el número 135565.

Clasificación botánica. División: Embriofitas sifonogamas. Clase: Dicotiledóneas. Orden: Campanulales. Familia: Compositae. Género: *Senecio*. Especie: *Formosus*:

Sinónimos. *Senecio formosus* H. B. K. Gen. Et. Sp. 4:177, 1.820. *Senecio tabacum* turcz. Bull. Soc. Nat. Mosc. 24 (2) ; 91, 1.851.

Nombres vulgares. Se conoce esta planta con los nombres de Arnica, Arnica falsa, Arnica de Bogotá (Páramo de Choachí), Arnica de páramo (Páramo de Guasca), Arnica colombiana, Cine-rarias.

Aunque el nombre vulgar de Arnica, coincide con el nombre vulgar de una planta europea, el Arnica montana, estas dos plantas son completamente distintas ya que pertenecen a diferentes géneros y especies; además, el Arnica europea no se conoce en Colombia ni aun en los jardines.

Habitat. Es una especie distribuida en los páramos de la Cordillera Oriental de Colombia y además en Venezuela y Ecuador. Crece en pisos térmicos comprendidos entre los 2.800 y 4.000 metros de altura sobre el nivel del mar. En Cundinamarca se halla distribuida entre otros lugares en: Páramo de Choachí, Páramo de Guasca y Páramo de Palacio. Es una planta que caracteriza los páramos y los embellece con sus grandes flores de un color morado vivo.

Recolección del material vegetal. El material fue recolectado en el Páramo de Guasca a 3.000 metros sobre el nivel del mar, el 27 de mayo de 1973, el 15 de septiembre de 1973 y en el Páramo de Palacio a 3.200 metros sobre el nivel del mar, el 6 de diciembre de 1973 y el 28 de abril de 1974.

Preparación del material vegetal. Se separaron las hojas del tallo, raíz y flores y se sometieron a un secamiento en estufa a una temperatura de 40°C durante 72 horas. Una vez seco el material, se molió por separado cada parte de la planta hasta polvo más o menos fino. El polvo obtenido se almacenó en frascos adecuados al abrigo de la luz. Este material así preparado se utilizó para los análisis y procesos de extracción. El polvo de las hojas es verde, fino, de olor característico repugnante.

El polvo de la raíz y tallo es grueso, de color pardo y olor característico.

Se observó al microscopio el polvo de las hojas con una solución saturada de hidrato de cloral, encontrándose: pelos glandulares formados de un pedúnculo de 4 a 5 células pequeñas; la célula basal se articula con las superiores formando ángulo, la terminal es mayor y ligeramente ovalada. Se encuentran, además, tricomas pluricelulares uniseriados de 5 a 6 células, células epidérmicas, estomas, fragmentos de nervaduras con anillos, cristales que posiblemente son de oxalato de calcio.

1. ESTUDIO FITOQUIMICO

1.1. *Marchas fitoquímicas.*

1.1.A. *Análisis fitoquímico preliminar.*

Se llevó a cabo con el polvo de las hojas y con el polvo de la raíz y tallo. Se siguió la técnica de M. E. Wall

y colaboradores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1).

1.1.B. *Marcha fitoquímica según Floriani.*

Con el polvo de las hojas del *Senecio formosus*, se llevó a cabo la marcha fitoquímica según Floriani (2), siguiendo el método rápido, especial para plantas medicinales (modificado), indicado por E. Calderón (3).

1.2. *Estudio de las sustancias grasas.*

1.2.A. *Métodos de extracción.*

Extracción con éter de petróleo: 50 g. del polvo de las hojas se colocaron en un extractor de Soxhlet y se procedió a un agotamiento durante 72 horas en baño de maría con 500 ml. de éter de petróleo. El extracto se concentró al vacío, con recuperación del éter de petróleo. Una vez eliminado el solvente quedaron las sustancias grasas.

No se ensayaron más métodos de extracción de las sustancias grasas, por considerarse que el método de extracción con éter de petróleo da resultados satisfactorios.

1.2.B. *Determinación cuantitativa de las sustancias grasas.*

Una vez escogido el método de extracción, se utilizó esta misma técnica para la determinación cuantitativa.

335,2 g. de polvo de las hojas se colocaron en un extractor de Soxhlet y se sometieron a una exhaustiva extracción con 1.5 l. de éter de petróleo durante 72 horas a baño de maría. El residuo obtenido, después de la eliminación del solvente por destilación pesó 23 g.

1.3. *Estudio de los alcaloides.*

1.3.A. *Extracción y purificación de los alcaloides.*

Se llevó a cabo una extracción etanólica según la técnica adoptada por Novelli (4), con algunas modificaciones.

200 g. del polvo de las hojas se colocaron en un extractor de Soxhlet y se sometieron a un agotamiento durante 72 horas en baño de maría con éter de petróleo; se dejó secar el material para eliminar el solvente.

El material desengrasado se sometió a una extracción en caliente con 3 porciones sucesivas de etanol del 95%, de tal manera que la proporción, polvo seco: etanol sea de 1:5.

El extracto alcohólico obtenido fue concentrado a baja temperatura y al vacío, con recuperación del etanol. El residuo obtenido después de la eliminación del solvente, fue tratado con porciones sucesivas de solución caliente de ácido cítrico al 2% hasta extracción completa de los alcaloides, de tal manera que el residuo no presente prueba positiva con los reactivos de precipitación. Se reunieron los extractos ácidos y se filtraron. La solución acuosa ácida se alcalinizó con solución de hidróxido de amonio aproximadamente a pH8 para la precipitación de los alcaloides, los cuales se extrajeron con cloroformo hasta completo agotamiento. Para purificar los alcaloides del *Senecio*, los extractos clorofórmicos fueron filtrados sobre sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y se reunieron en un mismo balón para la destilación del solvente. El residuo obtenido después de la eliminación del solvente fue tratado con sucesivas y pequeñas porciones de ácido cítrico al 2%, que fueron reunidas después de su filtración en un mismo embudo de decantación para una idéntica extracción clorofórmica.

Los extractos clorofórmicos reunidos fueron tratados con sulfato de sodio anhidro y destilados para la eliminación del solvente. Se obtuvo así una masa de un color amarillento y olor característico que pesó 1,04 g., y que corresponde a los alcaloides totales.

1.3.B. *Separación de los alcaloides.*

Cromatografía en capa fina. El uso de esta técnica para la separación e identificación de los alcaloides del grupo de la pirrolizidina, es más bien reciente.

Hasta ahora, los investigadores en este campo habían estado confinados solamente al uso de la cromatografía en papel para la detección y separación de estos compuestos (5, 6), pero con este método se gastaba mucho tiempo, era menos sensible, engorroso y se lograba sólo una separación incompleta.

Se ensayaron algunos solventes y adsorbentes encontrados en la bibliografía (7, 8, 9), así como también una serie de solventes, utilizando como adsorbente sílica gel G.

Muestra. Alcaloides totales brutos disueltos en cloroformo.

REACTIVOS

1. *Adsorbentes.*

Sílica gel G.

Sulfato de calcio $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.

2. *Solventes para la cromatografía.*

Benceno-acetato de etilo-dietilamina 70:20:10 v/v.

Cloroformo-metanol 85:15 v/v.

Cloroformo-metanol 90:10 v/v.

Cloroformo-metanol-amoniaco 95:5:0,5 v/v.

Acetato de etilo-cloroformo-metanol 40:40:20 v/v.

Cloroformo-acetato de etilo 50:50 v/v.

Benceno-cloroformo 50:40 v/v.

3. *Metanol.*

Benceno-cloroformo-acetona 70:15:15 v/v.

Ciclohexano-cloroformo-dietilamina 30:70:0,05 v/v.

Cloroformo-metanol-amoniaco 60:10:1.0 v/v.

Etanol-amoniaco 90:0,05 v/v.

Cloroformo-metanol-amoniaco 85:14:1 v/v.

Benceno-etano-amoniaco 30:70:2 gotas v/v.

PROCEDIMIENTO

Preparación de placas cromatográficas. Se lavaron las placas de vidrio con agua y jabón, se secaron, se colocaron en el alineador

o plantilla y se les pasó un algodón humedecido en cloroformo por la superficie.

Para cubrir la superficie de la plantilla de 110 x 20 cm. se emplearon en cada caso los adsorbentes y el agua en las siguientes cantidades:

1. Sílica gel G - agua 35:70 (p/v).

2. Sílica gel G - solución de hidróxido de sodio en agua N/10 30:60 (p/v).

3. Sílica gel G - sulfato de calcio $\frac{1}{2}$ H₂O - agua 27:3:60 (p/v).

Cada una de las mezclas enumeradas anteriormente se trasladaron a un Erlenmeyer, se agitaron fuertemente y acto seguido se transfirió la suspensión formada al extendedor, y con éste se aplicó sobre las placas una capa de 250 micrones de espesor.

Una vez extendido el adsorbente se dejaron sobre la plantilla por media hora y luego se activaron en la estufa a una temperatura de 120°C durante 90 minutos. Se dejaron enfriar en la estufa y en seguida fueron utilizadas.

Las cromatoplasmas preparadas con sílica gel G. fueron ensayadas con todos los solventes para la cromatografía.

Las cromatoplasmas preparadas con sílica gel G. y solución de NaOH fueron ensayadas con metanol, y las preparadas con sílica gel G., sulfato de calcio y agua fueron ensayadas con el solvente cloroformo-metanol-amoniaco 85:14:1 v/v.

Una vez desarrolladas las placas con el solvente respectivo se secaron a la estufa unos minutos y se revelaron con una solución del reactivo de Dragendorff según Munier y Macheboef para alcaloides y otros compuestos nitrogenados. Reactivo número 97 según Stahl (10).

Cromatografía comparativa. Con muestras de dos alcaloides del *Senecio*, retrorsina e integerrimina, gentilmente enviadas de la Universidad de San Pablo (Brasil) por el doctor Mario Motidome, fue posible llevar a cabo una cromatografía comparativa de estos dos alcaloides con el extracto total de los alcaloides del *Senecio formosus*.

El extracto clorofórmico de los alcaloides totales se colocó sobre placas de sílica gel G., de 250 micrones, junto con soluciones clorofórmicas de retrorsina e integerrimina patrones. Las placas se desarrollaron en forma ascendente con cloroformo-metanol-amoniaco 85:14:1 v/v., luego se secaron en la estufa por unos minutos y se revelaron con reactivo de Dragendorff.

Las placas se desarrollaron además con los siguientes solventes:
Cloroformo-metanol 85:15 v/v.

Metanol.

Benceno-cloroformo-acetona 70:15:15 v/v.

Benceno-etanol-amoniaco 30:70:2 gotas.

Con todos los solventes se empleó como soporte sílica gel G., a excepción del metanol con el cual se empleó sílica gel G., con solución de NaOH N/10.

Se anotaron los Rf obtenidos.

El aislamiento de cada uno de los alcaloides, la determinación de propiedades como punto de fusión, espectro infrarrojo, rotación específica y la preparación de derivados tales como picratos e iodometilatos serán objeto de otros trabajos.

2. ESTUDIO FARMACOLOGICO

Con el objeto de comprobar si la acción hepatotóxica del *Senecio formosus* es debida a sus alcaloides o a otro tipo de sustancias, se llevaron a cabo experimentos en ratones y ovejas.

Para los experimentos realizados en ratones se emplearon machos pesando entre 27 y 30 gramos, de aproximadamente 4 meses de edad, los cuales se colocaron en cajas de metal. Los ratones se mantuvieron con una dieta de alimento Purina (R) para ratones.

EXPERIMENTO 1

Toxicidad por vía oral de los extractos acuosos de las hojas completas y de las hojas desengrasadas. Se prepararon extractos acuosos de las hojas completas y de las hojas desengrasadas al 5%. Para cada uno de los extractos se trabajó con 20 ratones los cuales fueron divididos en dos grupos. A un grupo de diez ratones se les colocó como agua de bebida el extracto acuoso preparado con anterioridad, bebiendo como promedio cada ratón 2 ml. diarios del extracto, correspondiendo a una dosis diaria de 3,3 g./kg. El otro grupo de ratones fue tomado como patrón colocándoles como agua de bebida agua corriente. Los ratones fueron observados todos los días. Tres de los ratones que bebieron el extracto murieron al cabo de 4 semanas y sus hígados fueron extraídos para el examen histopatológico.

Al cabo de las 8 semanas, 2 ratones de los sobrevivientes que estaban tomando el extracto de la planta y 2 del grupo de control

fueron sacrificados y se prepararon porciones de sus hígados y riñones para el examen histopatológico.

EXPERIMENTO 2

Toxicidad por vía oral del extracto de las sustancias grasas. 50 g. del polvo de las hojas se sometieron a una extracción de las sustancias grasas como ya se indicó. Con el extracto graso se preparó una solución en aceite al 5%.

Se trabajó con 5 ratones, a 3 de los cuales se les dio por vía oral 0,5 ml. de la solución aceitosa. Dos ratones fueron dejados como patrones. Como no se observó reacción inmediata los ratones fueron dejados en observación dándoles agua y comida a voluntad. A las 4 semanas se sacrificaron los animales y fueron tomadas sus vísceras para un examen posterior.

EXPERIMENTO 3

Toxicidad por vía intraperitoneal de los extractos acuoso y alcohólico de las hojas. Con el polvo de las hojas fueron preparados un extracto acuoso y un extracto alcohólico al 1% con un pH final de 8,5. Para cada uno de los extractos se trabajó con 5 ratones, a tres de los cuales se les inyectó por vía intraperitoneal y en una dosis de 80 mg./kg. de peso corporal una solución isotónica al 1% del extracto. Los otros dos ratones fueron dejados como patrones inyectándoles intraperitonealmente solución salina con un pH igual al del extracto. Como no se obtuvo ninguna reacción inmediata, los ratones fueron dejados en observación, dándoles agua y comida a voluntad. Al cabo de las 8 semanas fueron sacrificados tanto los inyectados con el extracto como los patrones y sus hígados fueron extraídos para ejecutar posteriormente el examen histopatológico.

EXPERIMENTO 4

Toxicidad por vía oral de los alcaloides totales del polvo de las hojas. Se trabajó con una solución de los alcaloides totales obtenidos de la siguiente forma: 1,04 g. de los alcaloides totales obtenidos por el método de extracción ya descrito, se disolvieron en ácido cítrico al 1%. Se calentó y se filtró. Se neutralizó la solución ácida alcaloidal con soda 0,1 N sin que ocurriera precipitación de los alcaloides hasta un pH de aproximadamente 8. Se completó a volumen en un balón aforado de 1.000 ml., obteniéndose una solución alcaloidal al 0,1% con la cual se llevó a cabo el experimento.

Un número de diez ratones fueron utilizados como controles

a los cuales se les colocó como líquido de bebida agua corriente. A otros diez ratones se les colocó como agua de bebida la solución de los alcaloides totales al 0,1%, bebiendo cada ratón como promedio 2 ml. diarios de la solución de los alcaloides totales, correspondiendo a una dosis diaria de 66,6 mg./kg. Los ratones fueron observados todos los días. La muerte de los animales que bebieron el extracto alcaloidal ocurrió esporádicamente, al cabo de los 6, 22 y 30 días, pero el mayor índice de mortalidad se presentó a las siete semanas, al cabo de las cuales dos ratones de los sobrevivientes que estaban tomando el extracto y dos del grupo de control fueron sacrificados y se tomaron muestras del hígado, riñón y pulmón para el examen histopatológico.

EXPERIMENTO 5

Toxicidad por vía intraperitoneal de dosis únicas altas y bajas de los alcaloides totales. Se preparó una solución de los alcaloides totales al 0,33% P/V.

Se utilizaron doce ratones, a seis de los cuales se les inyectó por vía intraperitoneal una solución isotónica al 0,33% P/V. de los alcaloides totales.

Las dosis utilizadas fueron las siguientes:

Ratón Nº	Dosis mg./kg.
1	30
2	60
3	100
4	120
5	240
6	480

Los seis ratones restantes fueron dejados como patrones, inyectándoles intraperitonealmente solución salina. A medida como ocurrió la muerte de los ratones fueron extirpados sus hígados para el examen histopatológico.

EXPERIMENTO 6

Toxicidad por vía oral de una dosis única de los alcaloides totales. En este experimento se utilizó una solución de los alcaloides totales al 0,33% P/V. Fueron usados cinco ratones, a los cuales se

les administró una dosis única de 0,5 ml. del extracto total alcaloidal (60 mg./kg.) por medio de una sonda en el estómago. Los ratones fueron dejados en observación, dándoles agua y comida a voluntad; fueron sacrificados al cabo de 30 días y se tomaron muestras de sus hígados para un examen histopatológico posterior.

Los hígados de los animales de los experimentos 1 al 6 fueron primero tratados con formol para el examen histopatológico, se cortaron pequeñísimas secciones que fueron teñidas con hematoxilina-eosina, según la técnica de Harry.

EXPERIMENTO 7

Se llevó a cabo el último experimento en un ejemplar de la especie ovina, al cual se le suministró diariamente 1 g./kg. de peso de planta fresca por 25 días. Posterior a la administración del *Senecio formosus* se realizó un estudio hemático.

1. RESULTADOS

1.1. *Marchas fitoquímicas.*

Mediante el análisis fitoquímico preliminar se encontró que están presentes el mismo tipo de sustancias, tanto en las hojas como en la raíz y tallo, encontrándose los alcaloides en menor cantidad en estas dos últimas partes de la planta. Siendo los alcaloides una de las sustancias de mayor interés y estando en mayor proporción en las hojas, se escogieron éstas para realizar el presente trabajo, dejándose las otras partes de la planta para ser estudiadas en futuros trabajos.

TABLA I

Resumen de los resultados obtenidos en las marchas fitoquímicas llevadas a cabo con las hojas del Senecio formosus.

Saponinas	—
Taninos	+
Acidos orgánicos	+
Fenoles	+
Esteroles insaturados	+
Heterósidos cardiotónicos	—

Flavonoles	—
Alcaloides	+++
Resinas	—
Ceras	—
Grasas	+++
Fitosterol	—
Acidos grasos	+
Principios amargos	+
Pigmentos	—
Alcaloides volátiles	—
Acidos volátiles	—
Aceites esenciales	++

En la marcha fitoquímica, según Floriani, al realizar las pruebas para alcaloides al extracto obtenido con la mezcla éter etílico-cloroformo (1:1), no se obtuvo resultado positivo con ninguno de los reactivos de precipitación de los alcaloides. Dieron resultados positivos para alcaloides los extractos obtenidos con alcohol etílico de 95% y acetona. De lo anterior se deduce que la mezcla éter etílico-cloroformo, no es la más adecuada para la extracción de los alcaloides; siendo mejor solvente la acetona y más aún, para este fin, el alcohol etílico del 95%.

1.2. *Estudio de las sustancias grasas.*

Determinación cuantitativa. El peso de sustancias grasas obtenidas corresponde a un 6,85% P/P del polvo de las hojas consideradas como sustancia seca.

1.3. *Estudio de los alcaloides.*

1.3.A. *Determinación cuantitativa.*

El peso de los alcaloides brutos totales obtenidos corresponde a un 0,52% P/P del polvo de las hojas consideradas como sustancia seca.

1.3.B. *Separación de los alcaloides.*

Cromatografía en capa fina. Mediante el ensayo de diferentes adsorbentes y solventes se observó que

con el solvente para cromatografía cloroformo-metanol-amoniaco 85:14:1 v/v, se obtuvo la mejor separación de los alcaloides, empleando como soporte sílica gel G. Fueron detectados 7 alcaloides, uno de los cuales constituye el 50% del total y se consideró como el alcaloide principal.

Cromatografía comparativa. Los resultados obtenidos están descritos en la tabla siguiente:

TABLA II

Solvente: Cloroformo-metanol-amoniaco 85:14:1 V/V. — Placas: Sílica gel G. 250 micrones. — Revelador: Reactivo de Dragendorff.

Compuesto	Mancha N°	Ref.	Color
Ext. alcaloides	1	0.0	Naranja
	2	0.07	"
	3	0.11	"
	4	0.52	"
	5	0.74	"
	6	0.83	"
	7	0.91	"
Retrorsina	1	0.51	"
Integerrimina	1	0.83	"

El alcaloide principal, que constituye el 50% de los alcaloides totales y que corresponde a la mancha número 4, se aproxima bastante en sus características cromatográficas y su reacción frente al revelador, a las propiedades de la retrorsina patrón.

El alcaloide presente en la mancha número 6 es muy similar tanto en sus características cromatográficas como en su reacción frente al revelador, a la integerrimina patrón. Lo anterior se observó en todos los sistemas de solventes usados.

1.4. Estudio farmacológico.

Se llevaron a cabo estudios histopatológicos principalmente del hígado, por ser este el órgano más

afectado por este tipo de plantas. En algunos experimentos se examinaron los riñones y pulmones*.

EXPERIMENTO 1

Hígado: Macroscópicamente los hígados se observan aumentados de tamaño y de color más claro. Microscópicamente se observa marcada congestión de las sinusoides hepáticas, pérdida de la arquitectura lobulillar, marcada anisocitosis hepatocitaria (gran diferencia en el tamaño de las células hepáticas). Colestasis o marcada retención de bilirrubina en conductillos hepáticos. Presencia de gran cantidad de núcleos de hepatocitos aumentados de tamaño, los cuales presentan en su interior una disolución de la cromatina y regularmente poseen un corpúsculo o dos, homogéneos, de aspecto hialino. Estos cambios no fueron observados en los ratones controles.

EXPERIMENTO 2

Hígado: No se observó cambio en el tejido hepático.

Riñón: No hubo variación.

EXPERIMENTO 3

Macroscópicamente los hígados tienen un aspecto igual que en el experimento 1. La lesión observada microscópicamente consiste en congestión vascular, dilatación de sinusoides, pérdida de los límites celulares, presencia de vacuolas grasas en el citoplasma de los hepatocitos, especialmente en áreas perilobulillares, citoplasmas hinchados, núcleos hipercrónicos y cromatina fragmentada.

EXPERIMENTO 4

Hígado: Macroscópicamente los hígados se observan aumentados de tamaño y de color más claro. Microscópicamente se observa marcada degeneración grasa periportal y necrosis en general. La cromatina nuclear se encuentra fragmentada, las células hepáticas aumentadas de tamaño, de bordes irregulares y límites no muy notorios. Se observa macrocitosis, estasis biliar en los canalículos biliares. Se observa en el citoplasma de las células precipitaciones de un material homogéneamente eosinofílico; hiperplasia de células

* Los exámenes histopatológicos fueron efectuados por el doctor Alfonso Ruiz, Jefe de la Sección de Sanidad Animal del Instituto Colombiano Agropecuario, ICA.

de Kupffer y marcada congestión en las venas hepáticas, llegándose a una oclusión de las venas centrolobulillares.

Riñón: Macroscópicamente no se detecta cambio alguno. Microscópicamente se observa congestión marcada corticomodular. Glomérulos congestionados y distendidos, túbulos contorneados distales y proximales presentan degeneración parenquimatosa. Presencia de cilindros hialinos en túbulos colectores.

Pulmón: Microscópicamente se observa severa congestión vascular y edema pulmonar. Los ratones patrones no presentaron estos cambios.

EXPERIMENTO 5

A dosis altas, como las de 480 mg./kg., los animales sobrevivieron poco tiempo, muriendo a los 15 minutos y 3 días respectivamente. Dosis bajas, como la de 30 mg./kg., no tuvieron un efecto detectable, permitiendo a los animales sobrevivir ilesos por largos períodos de tiempo. Con las dosis intermedias de 60, 100 y 120 mg./kg., la muerte fue esporádica, muriendo los ratones números 3 y 4 a los diez y siete días. Los ratones números 1 y 2 fueron sacrificados a los 20 días de la inyección. En los exámenes histopatológicos, a excepción del ratón número 6, en los demás animales se produjeron lesiones progresivas del hígado, similares a aquellas observadas en el experimento anterior, con la característica de la megalocitosis de las células parenquimatosas como un rasgo constante y cambios en las venas centrales. Las lesiones fueron más marcadas a dosis mayores que a dosis menores.

A la dosis de 240 mg./kg. se observó necrosis centrolobular. No se determinó la DL_{50} , ya que no es una medida del daño hepático, puesto que el efecto no es a corto plazo sino a largo plazo.

EXPERIMENTO 6

Con una dosis oral única de los alcaloides totales del *Senecio formosus* se observaron los cambios característicos producidos por los alcaloides del grupo de la pirrolizidina descritos en el experimento 4.

EXPERIMENTO 7

Resultados hemáticos del ovino.

Hematocrito: No hubo variación.

Hemoglobina: No hubo variación.

Leucocitos: Disminuyeron progresivamente. En el recuento diferencial se observó aumento progresivo de neutrófilos con disminución de linfocitos.

Transaminasa Oxaloacética: Aumentó progresivamente de 24 U. I. hasta 138 U. I.

Bilirrubina total: Aumentó progresivamente, correspondiendo este aumento a la bilirrubina directa como la indirecta; siendo más marcado este incremento en la indirecta.

2. CONCLUSIONES

2.1. Estudio fitoquímico.

2.1.A. Según los resultados obtenidos en las marchas fitoquímicas llevadas a cabo con el polvo de las hojas del *Senecio formosus*, podemos concluir que las sustancias que la planta posee son:

Alcaloides.
Acidos.
Fenoles.
Taninos.
Principios amargos.
Aceites esenciales.
Grasas.
Esteroles.

2.1.B. Mediante el empleo de la cromatografía en capa fina se encontró que las hojas del *Senecio formosus* contienen siete alcaloides.

2.1.C. Por la intensidad de la coloración obtenida con los reveladores de las cromatoplasmas en las diferentes cromatografías se puede concluir que el alcaloide correspondiente a la mancha número 4 constituye el 50% de los alcaloides, siendo por lo tanto el alcaloide principal.

2.1.D. Los resultados consignados en la tabla II permiten concluir que el alcaloide principal correspondiente a la mancha número 4 es muy similar a la retrorsina patrón en su comportamiento cromatográfico y sus reacciones de color frente al revelador. Por lo anterior el alcaloide principal parece ser la retrorsina.

- 2.1.E. La tabla II pone de manifiesto que el alcaloide presente en la mancha número 6 es igual, tanto en sus características cromatográficas como en su reacción frente al revelador, a la integerrimina patrón; por lo cual el alcaloide presente en la mancha número 6 puede ser la integerrimina.
- 2.1.F. Se sugiere adelantar un estudio químico más detallado de los alcaloides, utilizando cantidades de material botánico del orden de cinco kilos y empleando la técnica de cromatografía en columna para su separación.

2.2. *Estudio farmacológico.*

- 2.2.A. Mediante la experimentación en pequeños animales de laboratorio se confirmó la acción tóxica del *Senecio formosus* al igual que otras especies de *Senecio*.
- 2.2.B. Los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 permiten concluir que las sustancias grasas no tienen nada que ver con las lesiones hepáticas producidas por la planta, ya que su administración aislada no produjo daño hepático, y al administrar el extracto de la planta desengrasada se presentó nuevamente dicho efecto.
- 2.2.C. El hecho de que al administrar el extracto total alcaloidal de la planta se hayan presentando lesiones hepáticas crónicas iguales a las observadas en el experimento 1 nos permite concluir que los alcaloides presentes son los únicos responsables de la acción hepatotóxica al ingerir el extracto por vía oral.
- 2.2.D. Se observaron lesiones del hígado agudas y crónicas al administrar el extracto de los alcaloides totales del *Senecio formosus*, tanto por vía oral como intraperitoneal; caracterizadas por la megalocitosis de las células del parénquima hepático y cambios en las venas centrolobulares similares a los observados en la enfermedad veno-oclusiva. La dosis elevada de los alcaloides que no causa la muerte del animal, trae consigo la producción de la lesión aguda caracterizada por una necrosis masiva centrolobular.

- 2.2.E. Los resultados obtenidos en los experimentos 3, 5 y 6, en los que se administraron dosis únicas tanto de los extractos de la planta como de los alcaloides totales, permiten concluir que los alcaloides presentes en la planta estudiada producen lesiones crónicas del hígado sin la necesidad de una dosis repetida.
- 2.2.F. Los resultados hemáticos del ovino del experimento 7, al cual se le suministró diariamente 1 g./kg. de peso, de *Senecio formosus* por 25 días, son similares a los resultados obtenidos en los exámenes de laboratorio de los pacientes de la serie de Vélez M., Toro G. y col. (11), que habían ingerido infusiones a base de *Senecio formosus*. No cabe por tanto duda de que esta planta es la responsable de los cambios hemáticos observados en tales pacientes y que es la causante de las intoxicaciones que se han presentado en ovinos que pastan en regiones donde crece dicha planta.
- 2.2.G. El *Senecio formosus* o falsa Arnica no debe usarse con las mismas finalidades terapéuticas del Arnica montana, puesto que son dos plantas completamente diferentes. Las infusiones de *Senecio formosus*, ingeridas por vía oral, antes de producir efecto medicinal alguno, causan la enfermedad veno-oclusiva hepática, ocurriendo tarde o temprano la muerte de las personas que la consumen. Dado el hábito tan común en nuestras gentes de ingerir bebidas medicinales a base de Arnica, se sugiere adelantar una campaña en la que se informe sobre el gran peligro a que se exponen al tomar tales infusiones.

RESUMEN

Dentro del proyecto de investigación sobre plantas medicinales copatrocinado por Colciencias, se llevó a cabo el estudio fitoquímico y farmacológico del *Senecio formosus*, comúnmente conocido como Arnica. Por medio de marchas fitoquímicas se determinó la naturaleza de las sustancias que posee esta planta. Se aislaron las grasas y los alcaloides y por medio del empleo de la cromatografía en capa fina se encontró que las hojas del *Senecio*

formosus contienen siete alcaloides, dentro de los cuales parecen estar presentes la retrorsina y la integerrimina.

Con el objeto de comprobar si la acción hepatotóxica del *Senecio formosus* es debida a sus alcaloides o a otro tipo de sustancias se llevaron a cabo una serie de experimentos en roedores y ovinos, encontrándose que los alcaloides son los únicos responsables de la acción hepatotóxica. Se observaron lesiones del hígado agudas y crónicas al administrar el extracto de los alcaloides totales, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal. La lesión crónica se caracterizó por la megalocitosis de las células del parénquima hepático y por cambios en las venas centrolobulares similares a los observados en la enfermedad veno-oclusiva. Además del daño hepático, se encontraron lesiones renales y del pulmón.

SUMMARY

This paper presents the results obtained in the phytochemical and the pharmacological studies of *Senecio formosus* (commonly known as Arnica). The fats and the alkaloids of the leaves were isolated by TLC. Among seven alkaloids detected the retrorcine and the integerrimine are most likely to be present. The experiences made in rats and sheeps showed that the alkaloids are responsible for the hepatotoxic effects of this plant. The extract of the total alkaloids, when administered via oral or intraperitoneal caused both chronic and acute pathological changes in the liver. The chronic pathological change consisted mainly of megalocitosis of the cells of the liver parenchyma and changes in the centrolobar veins, very similar to the changes observed in the venoclusivedisease. Besides this effects it causes damage in the kidneys and the lungs.

RÉSUMÉ

Une étude phytochimique et pharmacologique de *Senecio formosus* (vulgairement connue comme Arnica) a été réalisée. La nature des substances contenues dans cette plante a été déterminée par des procédés phytochimiques.

Nous avons isolé les lipides et les alcaloïdes et établi par chromatographie en couche mince que les feuilles de *Senecio formosus* contiennent sept alcaloïdes, parmi lesquels semblent se trouver la rétrorcine et la integerrimine.

Des expériences in vivo sur des rongeurs et des ovins ont montré que l'action hepatotoxique de *Senecio formosus* est que exclusivement aux alcaloïdes. Nous avons observé des lésions aiguës et chroniques du foie par application de l'extrait des alcaloïdes totaux tant par voie orale que par voie intrapéritonéale. La lésion chronique est caractérisée par une mégalocytose des cellules du parenchyme hépatique et par des modifications dans les veines centrolobulaires similaires a celles observées dans les troubles vénoclosifs. Des lésions rénales et pulmonaires ont également été constatées.

BIBLIOGRAFIA

1. WALL, M. E., J. AM. PHARM. Ass. Sie. Ed. 43, 1, 1954. Según Calderón, E., "Guía para el Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica". Conferencias Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 13, 1963.
2. FLORIANI, L. Análisis Químico de los Vegetales, Editorial Vásquez, Buenos Aires, 59, 1938.
3. CALDERÓN, E. "Guía para el Análisis de Plantas y Notas Prácticas sobre Fitoquímica". Conferencias Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 38, 1963.
4. NOVELLI, A., VARELLA, A. P. G. DE. Anales. Assoc. Quim. Argentina, 33, 176, 1945.
5. ADAMS, R., GIANTURGO, M. The Alkaloids of *Crotalaria Juncea*, J. Am. Chem. Soc. 78, 1919, 1956.
6. CULVENOR, C. C. J., AUSTRALIAN J. CHEM. 7, 287, 1954.
7. STAHL, E. Thin-Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Segunda edición, Academic Press Publishers, New York, 435, 1969.
8. SHARMA, R. K., KHAJURIA, G. S. y col. Thin-Layer Chromatography of Pyrrolizidine Alkaloids, J. Chromatog, 19, 433, 1965.
9. CHALMERS, A. H., CULVENOR, J. C. C. y col. Characterization of Pyrrolizidine Alkaloids by Gas Chromatography. Thin Layer Chromatography and Paper Chromatography, J. Chromatog. 20, 270, 1965.
10. STAHL, E. Op. cit., 873, 1969.
11. VÉLEZ, M., TORO, G. y col. Enfermedad Venocclusiva del Hígado. Tribuna Médica, 7, Nº 347, 1, julio 1968.