

EFFECTO ANTIDIABÉTICO Y TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO ACUOSO DEL *Phyllanthus Sellowianus* Müller Arg.

Oksana Hnatyszyn*, Jorge Miño**, Susana Gorzalczany**, Graciela Ferraro*, Jorge D. Coussio* y Cristina Acevedo**.

* Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, IQUIMEFA (UBA-CONICET).

** Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Junín 956, (1113) Buenos Aires, República Argentina.

Resumen

Se estudió el efecto antidiabético del extracto acuoso (5% P/V) de *Phyllanthus sellowianus* Müller Arg. (Euphorbiaceae) en ratas normales y ratas con diabetes inducida mediante estreptozotocina (STZ). El nivel de glucosa se midió a las 3 semanas de una administración diaria del extracto a la dosis de 4 ml/100 g (correspondiente a 2 g de material seco/kg). Se compararon los niveles registrados antes del tratamiento con los obtenidos posteriormente.

Los resultados demostraron que la administración del extracto acuoso de *P. sellowianus* baja en forma significativa el nivel de glucosa en ratas con diabetes inducida. En los estudios sobre toxicidad aguda no se produjo mortalidad ni se registraron alteraciones en la signología neurológica ni autonómica.

ANTIDIABETIC EFFECT AND ACUTE TOXICITY OF AQUEOUS EXTRACT OF *Phyllanthus Sellowianus* Müller Arg.

Summary

Investigations to evaluate the effect of the aqueous extract (5% w/v) of the stem barks of *Phyllanthus sellowianus* Müller Arg. (Euphorbiaceae) on normal and streptozotocin (STZ) in induced diabetic rats were carried out. Blood glucose levels were estimated 3 weeks after daily administration of the extract at the dose of 4 ml/100 g body weight (corresponding to 2 g of dry plant material/kg body weight) and was compared to the pre-treatment levels.

The results show that the administration of the extract significantly lowered the blood glucose levels in the streptozotocin (STZ)- induced diabetic rats. In the studies on acute toxicity neither mortality nor neurologic alterations could be observed.

Introducción

El género *Phyllanthus* abarca alrededor de 750 especies ampliamente distribuidas en el mundo, principalmente en las regiones templadas y tropicales. Según las estimaciones de Cabrera ⁽¹⁾, en la Argentina se encuentran seis especies: *P. acuminatus* Vahl. (Salta); *P. lathyroides* H.B.K. (Misiones, Salta, Jujuy, Tucumán, Corrientes, Chaco, Entre Ríos y Buenos Aires); *P. marginivillosa* Speg. (Jujuy); *P.*

Palabras claves: *Phyllanthus sellowianus*, extracto acuoso, efecto antidiabético, toxicidad aguda.

Key words: *Phyllanthus sellowianus*, aqueous extract, antidiabetic effect, acute toxicity.

montevicensis Müller Arg. (Misiones); *P. niruri* L. (Misiones, Formosa, Chaco) y *P. sellowianus* Müller Arg. (Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires).

Según Hunziker ⁽²⁾, ocho especies están distribuidas por diferentes lugares del territorio argentino. Las especies señaladas por Hunziker son las siguientes: *P. fluitans* Müller Arg.; *P. acuminatus* Vahl. (Salta); *P. ramillosus* Müller Arg. (Sierras Pampeanas, Córdoba, Catamarca); *P. caroliniensis* Walt. (Misiones, Corrientes, Córdoba); *P. tenellus* Roxb.; *P. stipulatus* (Raf.) Webst.; *P. niruri* L. (Misiones, Formosa, Chaco) y *P. sellowianus* Müller Arg. (Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires). *Phyllanthus sellowianus* Müller Arg. (Euphorbiaceae) es una especie arbustiva de aproximadamente 4 m de altura, con ramas leñosas y ramitas superiores muy delgadas; se conoce con el nombre vulgar de "sarandí blanco" o "sarandí leño" ^(3,4). Esta especie está distribuida en zonas anegadizas o húmedas de la región Noreste de nuestro país, así como también en Uruguay, Paraguay y sur del Brasil ^(5,6).

Las infusiones preparadas con los tallos y las hojas de esta especie se utilizan ampliamente en medicina popular como antidiabéticas y diuréticas ^(7,8). También se aplican a otros usos, como purgante, antiséptico y antiespasmódico ⁽⁹⁻¹¹⁾. El uso de esta especie está tan difundido que la Farmacopea Nacional Argentina, VI Ed., la incluye entre las drogas de origen vegetal en la monografía correspondiente a la especie citada con el nombre de "Sarandí blanco" ⁽¹²⁾.

Los estudios fitoquímicos realizados en los últimos años permitieron aislar e identificar diversos compuestos de esta planta medicinal ⁽¹³⁾. Del extracto hexánico se aisló un triterpeno pentacíclico: el phyllanthol (13-27-cicloursan-3 β -ol) ⁽¹⁴⁾. Del extracto acetónico fue aislado un biflavonoide: la 4', 4'' di-O-metil cupressuflavona ⁽¹⁵⁾. Del extracto metanólico se aislaron los ácidos clorogénico y cafeico y una flavanona: la 7-hidroxi-flavanona ⁽¹⁶⁾. Del extracto acuoso, extraído en L/L con diclorometano, se aislaron dos cumarinas: la isofraxidina (7-hidroxi-6,8-di-metoxi cumarina) y escopoletina (7-hidroxi-6-metoxi cumarina) ⁽¹⁷⁾ y del remanente acuoso, los azúcares levulosa, sacarosa, glucosa y galactosa ⁽¹⁶⁾.

En este trabajo se describen los estudios realizados sobre el extracto acuoso de *P. sellowianus*:

1. Efecto antidiabético en ratas con diabetes inducida con estreptozotocina.
2. Toxicidad aguda.

Materiales y métodos

Material vegetal

La corteza de las ramas de *P. sellowianus* se recolectaron en Concepción del Uruguay, provincia de Entre Ríos. Un ejemplar de herbario se guarda en la Cátedra de Farmacognosia, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Preparación del extracto acuoso

El extracto acuoso empleado en los ensayos se preparó diariamente. Se utilizó

una infusión con 100 ml de agua hirviendo y 5 g de material vegetal seco y pulverizado. Se dejó en reposo durante 20 minutos y luego se filtró.

Animales

Se utilizaron ratas macho adultas (entre 180-200 g) de la cepa Wistar, mantenidas en el bioterio a 25 °C con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y alimentadas con dieta comercial para roedores y agua *ad libitum*. Para los estudios de toxicidad aguda se utilizaron ratones CF1 de ambos sexos con un peso que oscilaba entre los 18 y 22 g.

Inducción de diabetes

La diabetes se indujo mediante una única administración intraperitoneal (día 0) de estreptozotocina (Sigma) a la dosis de 60 mg/kg . La droga se disolvió en buffer citrato (0.01 M, pH 4.5) y se preparó inmediatamente antes de su administración.

Los animales fueron considerados diabéticos cuando al quinto día posterior a la inducción los valores séricos de glucosa fueron superiores a 180 mg % ⁽¹⁸⁾.

Estimación de los niveles de glucosa

Se sometieron las ratas a un ayuno de 18 horas. Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción del seno retro-orbital y se estimaron los niveles de glucosa en los días 0, 5 y 26, en todos los grupos con tiras reactivas Accutrend glucose cuantificadas en un Ames Glucometer ⁽¹⁹⁾.

Tratamiento

Para el tratamiento se utilizaron ratas que estaban distribuidas en cuatro grupos de 10 ratas cada uno.

- Grupo 1: Ratas no diabéticas controles (NDC). El día 0 se les administró vía i.p. el vehículo utilizado como disolvente para la estreptozotocina y, a partir del día 5 y durante 21 días, agua por vía oral a una dosis de 4 ml/100 g.
- Grupo 2: Ratas no diabéticas tratadas (NDT). Recibieron el vehículo en el día 0 como las del grupo anterior, y a partir del día 5 y hasta el día 26 fueron tratadas por vía oral con la infusión de *P. sellowianus* a una dosis de 4 ml/100 g (correspondiente a 2 g de material seco/kg).
- Grupo 3: Ratas diabéticas controles (DC). Recibieron en el día 0 estreptozotocina vía i.p. (60 mg/kg de peso) y, posteriormente, desde el día 5 y durante 21 días, se les administró agua por vía oral a una dosis de 4 ml/100 g de peso.
- Grupo 4: Ratas diabéticas tratadas (DT). Recibieron en el día 0 la estreptozotocina como el grupo anterior, pero posteriormente recibieron, desde el día 5 y durante 21 días, por vía oral, la infusión de *P. sellowianus* a una dosis de 4 ml/100 g (correspondiente a 2 g de material seco/kg) .

Estudio de la toxicidad aguda

En el estudio de la toxicidad aguda se usaron 10 ratones (5 machos y 5 hembras) de la cepa CF1 de 18 a 22 g de peso. Los animales recibieron por vía oral el extracto acuoso liofilizado de *P. sellowianus* en una dosis de 3 g/kg .

A partir de la administración, y durante 15 días, se observaron los perfiles de comportamiento y los signos neurológicos, autonómicos y de mortalidad. A los 15 días los animales se sacrificaron por tracción cervical y se les practicó la autopsia para efectuar la observación macroscópica de los órganos principales (corazón, pulmones, estómago, intestinos delgado y grueso e hígado).

Análisis estadístico

Los datos se procesaron por análisis de varianza de una vía. La significación de las diferencias entre las medias para los cuatro grupos fue determinada mediante el Test de Tukey-Kramer de comparaciones múltiples. Los valores son considerados significativamente diferentes a $p < 0.05$. Todos los resultados están expresados como la media \pm EEM.

Resultados y discusión

La inducción de la diabetes se confirmó en el día 5 por un incremento significativo de los valores de glucemia en los dos grupos inducidos con estreptozotocina (DC y DT) (Fig.1). Esos valores (>180 mg %) concuerdan con los informados en trabajos anteriores ^(20,21). En el grupo de ratas diabéticas tratadas durante 21 días con la infusión (DT) se observó una reducción significativa de la glucemia en el día 26 cuando se la comparó con los valores de su grupo control (DC), como así también con respecto a los valores obtenidos para ambos grupos en el día 5.

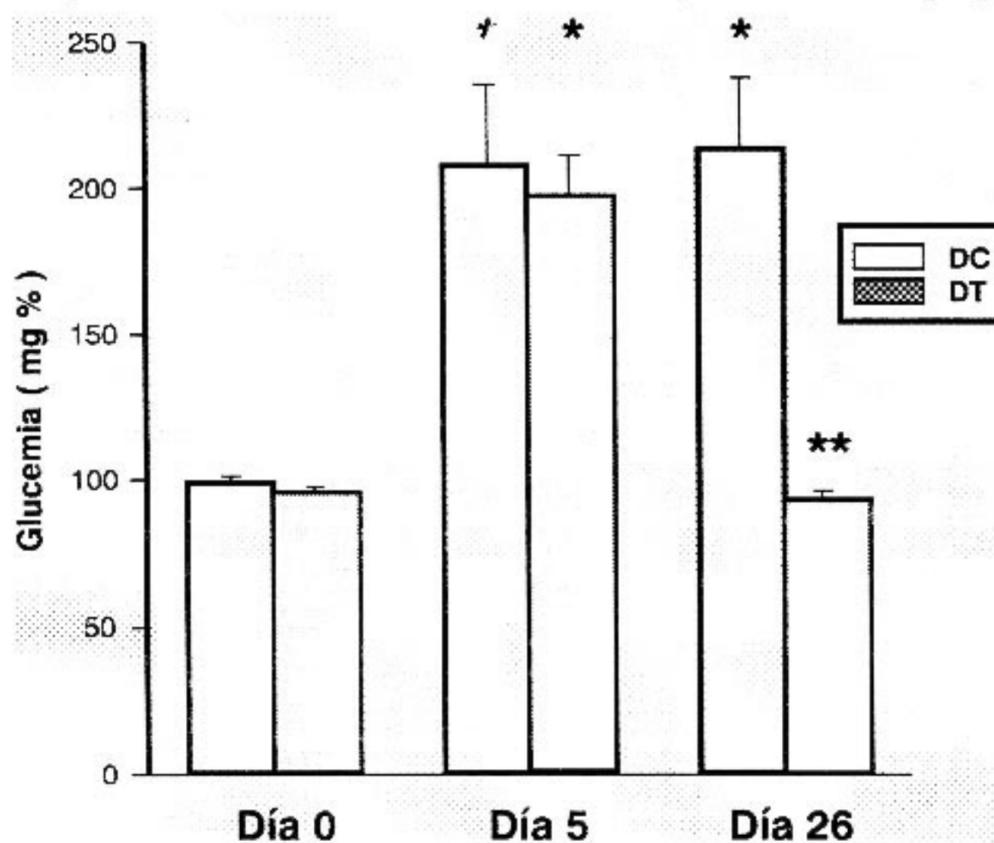


Figura 1. - Efecto de las infusiones de *P. sellowianus* sobre los niveles de glucemia en ratas diabéticas. DC: Diabético control. DT: Diabético tratado.

n=10 en cada grupo. Valores expresados como media \pm EEM. * $p < 0.001$ contra día 0. ** $p < 0.001$ contra su control (día 26).

Por otra parte, el grupo de ratas no diabéticas, tratadas con la infusión (NDT), no mostraron variaciones significativas en los valores medios de la glucemia durante todo el período de experimentación; los niveles se mantuvieron similares a los del grupo control no tratado (NDC) (Tabla 1).

GRUPOS	GLUCEMIA (mg%)		
	DÍA 0	DÍA 5	DÍA 26
NDC	99,7 ± 2,2	97,3 ± 1,1	96,1 ± 1,4
NDT	95,9 ± 2,8	94,9 ± 3,0	96,4 ± 3,8

Tabla 1. Niveles de glucemia en grupos no diabéticos

NDC : Control no diabético.

NDT : Grupo no diabético tratado diariamente con la infusión de *P. sellowianus* (2 g/kg p.o.) durante 26 días.

Valores expresados como media ± EEM.

En el estudio de toxicidad aguda, la administración de la infusión de *P. sellowianus* no produjo mortalidad ni se observaron signos de alteraciones en los perfiles de comportamiento, neurológicos o autonómicos, con respecto a la dosis utilizada. En la necropsia no se detectaron cambios macroscópicos de los órganos observados.

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar indican que la infusión de *P. sellowianus* presentó actividad antidiabética en el grupo con diabetes inducida (DT). Ese efecto no se observó cuando la infusión se administró a ratas normales. Esta diferencia sugiere que las infusiones de *P. sellowianus* pueden ser efectivas en el tratamiento de la diabetes, razón que avalaría su utilización en medicina popular. Estudios posteriores permitirán establecer la naturaleza química de los constituyentes responsables del efecto, así como su mecanismo de acción.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT) por su apoyo económico. Al Ing. Gustavo Giberti por la recolección e identificación del material vegetal. Esta investigación forma parte del Proyecto X-1 Subprograma X, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

Referencias bibliográficas

1. Cabrera, A.L. (1965). *Flora de la Provincia de Buenos Aires*, tomo IV, Colección Científica, INTA, Buenos Aires: 72-74.

2. Hunziker, A.T. (1967). "Contribución al conocimiento de las especies Argentinas de *Phyllanthus*", *Kurtziana* 4: 19-20.
3. Hieronymus, J. (1882). *Plantae Diaphoricae, Florae Argentinae*, tomo IV, Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba, Buenos Aires: 446.
4. Ratera, E.L. y Ratera, M.O. (1980). *Plantas de la Flora Argentina empleadas en Medicina Popular*. Hemisferio Sur, Buenos Aires: 143-144.
5. Lorentz, P.G. (1947). *La Vegetación del Nordeste de la provincia de Entre Ríos*. 2a. Ed., Paraná: 55.
6. Sorarú, S.B. y Bandoni, A.L. (1978). *Plantas de la Medicina Popular*. Albatros, Buenos Aires: 53-55.
7. Bandoni, A.J., Celsi, S.A. y Cignoli, F. (1951). "Repertorio simplificado de plantas medicinales del país". *Rev. Farm.* 93: 64-76.
8. Cristiani, L.Q. y Amorín, J.L. (1972). "Estudio preliminar del sarandí blanco, *Phyllanthus sellowianus* Müller Arg. (Euphorbiaceae)". *Rev. Farm.* 114: 3-11.
9. Parker, J. (1949). *Mil Plantas Medicinales*. Colección de Obras Científicas, Buenos Aires: 208.
10. Tempesta, M.S. y col. (1988). "Phyllanthimide, a New Alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*". *J. Nat. Prod.* 51: 617-618.
11. Amorín, J.L. (1980). "Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico". *Rev. INFYB* 3(7): 101.
12. *Farmacopea Nacional Argentina*. (1978), 6a. Ed.: 810.
13. Hnatyszyn, O. (1993). "*Phyllanthus sellowianus* Müller Arg. Aislamiento y determinación de las estructuras de los compuestos fenólicos y triterpénicos". *Tesis doctoral*: Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.
14. Hnatyszyn, O. y Ferraro, G. (1985). "Phyllanthol from *Phyllanthus sellowianus*". *Planta Medica* 5: 467.
15. Hnatyszyn, O., Ferraro, G. y Coussio, J. D. (1987). "A biflavonoid from *Phyllanthus sellowianus*". *J. Nat. Prod.* 50: 1.156-1.157.
16. Hnatyszyn, O., Ferraro, G. y Coussio, J.D. (1995). "Constituents of *Phyllanthus sellowianus*". *Fitoterapia* 66: 543.
17. Hnatyszyn, O., Ferraro, G. y Coussio, J.D. (1995). "Coumarins of *Phyllanthus sellowianus*". *Fitoterapia* 64: 556.
18. Gawler, D., Milligan, G. y Houslay, D. (1988). "Treatment of streptozotocin-diabetic rats with metformin restores the ability of insulin to inhibit adenylate cyclase activity and demonstrates that insulin does not exert this action through the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi". *Bioch. J.* 249: 537-542.
19. Trejo-González, A., Gabriel-Ortiz, G., Puebla-Pérez, A., Huizar-Contreras, M., Manguia-Mazariegos, M., Mejía-Arreguin, S. y Calva, E. (1996). "A purified extract from prickly pear Cactus controls experimentally induced diabetes in rats". *J. Ethnopharmacol.* 55: 27-33.
20. Peter, H. y Bennett, M. (1983). *Diabetes Mellitus: Theory and Practice*. Ellenberg, M. and Ritfkin, H. (Eds.). Medical Examination Publishing Co. Inc., N.Y. : 409-414.
21. Adoga, G.I. e Ibrahim, M.B. (1990). "Effect of garlic oil on some biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats". *Med. Sc. Res.* 18: 859-860.