

Estudio farmacológico de senecionina alcaloide pirrolizidínico de

Senecio fistulosus Poepp. ex Less. (Hualtata).

por

GONZALEZ, E., GARCIA R., LEMUS I. ERAZO S.

*Departamento de Ciencias Farmacológicas. Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas. Universidad de Chile.*

Casilla 233 - Santiago, Chile

RESUMEN

Se ha determinado mediante ensayos en aurícula aislada de cobayo los efectos sobre la fuerza de contracción y frecuencia cardíaca de Senecionina, alcaloide pirrolizidínico aislado de *Senecio fistulosus* Poepp ex Less. (Hualtata).

SUMMARY

Working with isolated guinea pig atria, we have determined the effect over the contraction and cardiac frequency produced by Senecionine, the pyrrolizidine alkaloid isolated from *Senecio fistulosus* Poepp. ex Less (Hualtata).

Palabras claves: Senecionina-Alcaloide pirrolizidínico-*Senecio fistulosus* Poepp.ex Less. (Hualtata) Actividad cardíaca.

INTRODUCCION

Hualtata es el nombre vernacular de la droga consistente en el rizoma de *Senecio fistulosus* Poepp. ex Less. familia de las Asteraceae. Esta planta crece en forma silvestre en las regiones Central y Sur de Chile y su uso está ampliamente difundido por la medicina popular de nuestro país por sus efectos sobre el corazón (1, 2).

Estudios realizados con diversos extractos de este rizoma, han descrito diversas acciones farmacológicas sobre el músculo cardíaco (3,4, 5, 6, 7) siendo una de las más interesantes, la de ser antifibrilante de dicho músculo (8,9).

Debido a que el género *Senecio* se caracteriza por poseer una gran variedad de alcaloides pirrolizidínicos, particularmente los del tipo macrociclo diésteres que se han caracterizado como potentes tóxicos (10, 11, 12, 13), se hace esencial conocer la composición química de esta droga para evitar acciones tóxicas frente a su uso indiscriminado.

MATERIALES Y METODOS

I.— Fitoquímico

Se realizó un análisis químico preliminar para obtener una información general acerca de la composición química de esta especie, evidenciando mediante reacciones de coloración y/o precipitación y por otros métodos específicos (14, 15, 16) realizados en las cromatografías en capa fina de los diferentes extractos, la presencia de flavonoides, alcaloides, esteroides y cumarinas,

Mediante un seguimiento fitofarmacológico se evaluó la actividad farmacológica de los diversos extractos, evidenciando por este método cuales eran los biológicamente activos y así poder centrar nuestro estudio químico.

Extracción y separación de senecionina.

El rizoma de *Senecio fistulosus* P. (Hualtata) colectado en la localidad de Quintero (Valparaíso) en Marzo de 1984 fue estabilizado y molido, obteniéndose 2,5 kg. (Muestra N° 1621 Herbario Facultad).

Esta droga seca y molida fue extraída sucesivamente con éter de petróleo (60–80°) y metanol en un aparato de Soxhlet.

El extracto metanólico fue llevado a sequedad bajo presión reducida, macerado con una solución (1 L) de ácido acético 2N y filtrado. La solución acuosa resultante se alcalinizó con amoníaco (25 %) y se extrajo con cloroformo. El extracto cloroformico fue llevado a sequedad, obteniéndose 7,3 g de un residuo amarillo, el cual fue purificado mediante una columna cromatográfica de Oxido de Aluminio (Actividad III, Merck) montado en éter de petróleo y eluída con mezcla de porcentajes crecientes de cloroformo en éter de petróleo.

Las fracciones eluídas con la mezcla éter de petróleo/cloroformo (entre 20% a 30%) presentaban un alcaloide con Rf 0,5 en la cromatografía de placa fina de gel desílce (Merck) con la mezcla cloroformo/metanol (9:1). Estas fracciones fueron juntadas y purificadas mediante una nueva columna cromatográfica de Florisil (BDH), montada en cloroformo y eluída con mezcla de cloroformo con porcentajes crecientes de metanol.

El alcaloide SENEACIONINA (C₁₈ H₂₈ NO₅) fue obtenido de la fracción cloroformo/metanol (10%), cristalizando de acetato de etilo en forma de agujas (0,20 g) con las siguientes características:

Peso molecular:	335 (espectrometría de masas)
Análisis elemental:	% encontrado C (64, 53); H (7, 56); N (4, 22). % calculado C (64, 48); H (7, 53); N (4, 17).
Punto de fusión:	222-224°C (lit (17) 222-224°C)

$$(\alpha)_D^{20} = -60 \text{ (c 1.0 CHCl}_3\text{)} \text{ (lit 17) } - 56 \text{ (CHCl}_3\text{)}$$

UV λ Máx MeOH nm: 217 (log ξ 3,48)

IR ν Máx KBr cm^{-1} : 3.440 (OH), 3.080 (C=C), 1.735 (éster saturado), 1.705 (éster no saturado), 1.667 (C=C).

IR Máx CC cm^{-1} : 1760 (las dos bandas de los grupos ésteres coalescen).

$^1\text{H-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , ppm (TMS): 6,20 (1H, m, C-H2); 5,72 (1H, q, C-H20, $J = 12$ Hz, $J' = 2$ Hz); 5,54-4,07 (2H, d, C-9H₂, $J = 12$ Hz); 5,02 (1H, m, C-H7); 4,28 (1H, m C-H8); 3,94-3,38 (2H, d, C-3H₂, $J = 16$ Hz); 3,37-2,64 (2H, m, C-5H₂); 3,25 (1H, s, C-12 OH); 2,48-1,68 (2H, m, C-14H₂); 2,24-2,08 (2H, m, C-6H₂); 1,83 (3H, dd, C-21 H₃); 1,58 (1H, m, C-H13); 1,32 (3H, s, C-18H₃); 0,92 (3H, s, C-19H₃) (18).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) ppm: 178,2 (C-11); 167,5 (C-16); 136,5 (C-2); 134,2 (C-20); 133,2 (C-1); 131,5 (C-15); 77,9 (C-8); 76,7 (C-12) 74,9 (C-7); 62,9 (C-3); 60,5 (C-9); 52,9 (C-5); 38,5 (C-13 y C-14) 34,9 (C-6); 24,9 (C-18); 15,2 (C-21); 11,2 (C-19) (19).

Ms 70 eV. m/z (% intensidad relativa) : 335 (M)⁺(19,9); 291 (M-COO)⁺(7,9); 246 (M-C₃H₅O₃)⁺(32,7); 220 (291-C₄H₇O)⁺(61, 8) y un grupo de fragmentos típicos correspondientes a la necina (retronecina) m/z 139, 138, 137, 136, 121, 120 (100%), 119, 95, 94, 93 y 80 (20).

II. Parte Farmacológica

MATERIALES Y METODOS

Cobayos de ambos sexos de peso promedio 490 g se sacrificaron por contusión cervical y sangramiento. Abierto el tórax, se extrajo rápidamente el corazón transfiriéndose a una solución de Krebs donde se disectaron las aurículas y se colocaron en un baño de doble pared de 10 ml que contiene solución de Krebs a 37°C oxigenada con una mezcla 5% CO₂ en O₂. la composición de la solución de Krebs (mM/l) es la siguiente: NaCl 117.0; CaCl₂ × 2 H₂O 1,84; MgCl₂ × 6 H₂O 0,54; KCl 5,90; Na₂HPO₄ × 2H₂O 0,84; NaHCO₃ 25.0; Glucosa 11.1.

La fuerza contráctil y la frecuencia se midieron con un transducer isométrico Nihon-Kohden T B 612-T acoplado al canal amplificador AP620-G de un polígrafo Nihon-Kohden R M-6000. El curso de cada experiencia se siguió mediante un osciloscopio Nihon-Kohden VC 640-G. Las preparaciones se sometieron a una tensión basal de 0,5 g y a una calibración de 10 mm/g.

Las curvas concentración-efecto tanto para fuerza como para frecuencia se realizaron de acuerdo al método de Van Rossum (21) la magnitud de los efectos obtenidos sobre fuerza y frecuencia se expresaron como una fracción del efecto máximo (E/E_{max}).

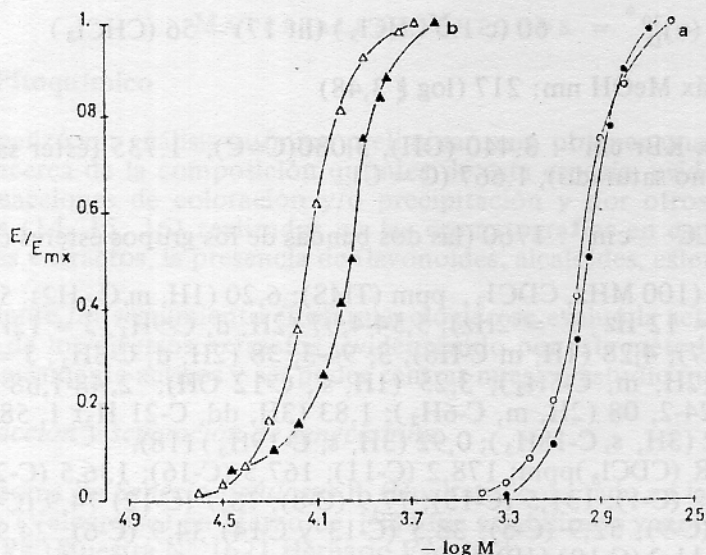


Figura 1.— Curvas concentración efecto de disminución de fuerza en aurícula aislada de cobayo. Ordenada: Disminución de fuerza expresada como fracción del efecto máximo (E/E_{mx}). Abscisa Logaritmo negativo de la concentración molar. a: (○) Senecionina; (●): Senecionina en presencia de Atropina; b: (△) Quinidina; (▲) Quinidina en presencia de atropina. Cada punto representa el promedio de 10 casos.

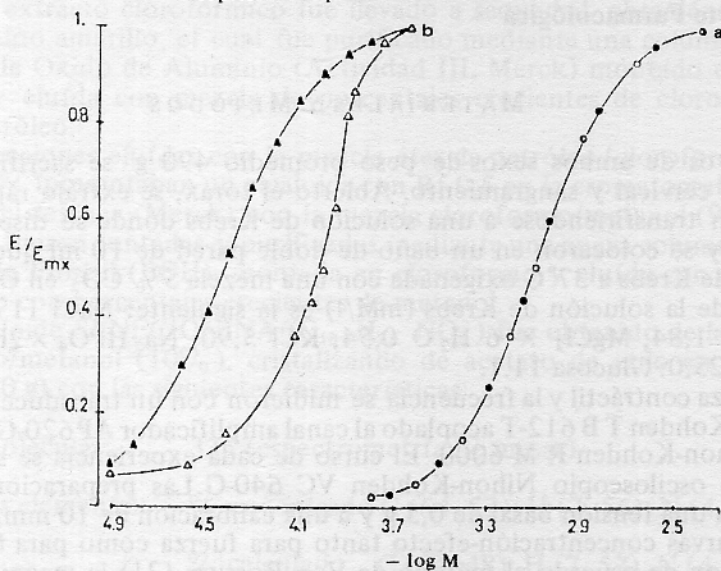


Figura 2.— Curvas concentración efecto de disminución de frecuencia en aurícula aislada de cobayo. Ordenada: Disminución de frecuencia expresada como fracción del efecto máximo (E/E_{mx}). Abscisa: logaritmo negativo de la concentración molar. a: (○) Senecionina; (●) Senecionina en presencia de Atropina. b: (▲) Quinidina (△) Quinidina en presencia de Atropina. Cada punto representa el promedio de 10 casos.

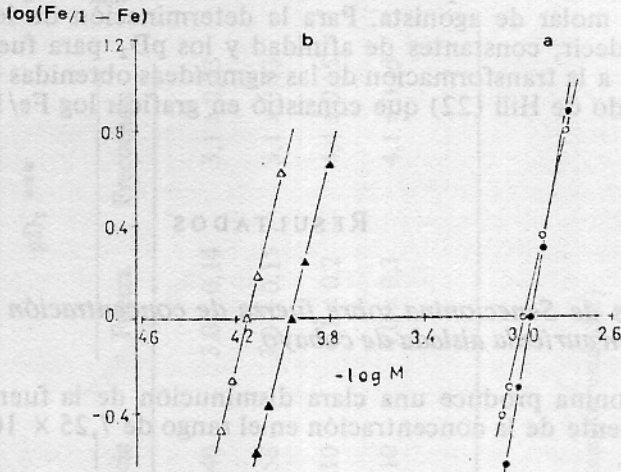


Figura 3.— Gráfico de Hill para la disminución de fuerza. Intercepto en la abscisa corresponde al pD_2 . F_e es la fracción de efecto con respecto al efecto máximo (E/E_{mx}). M: Concentración molar a: (○) Senecionina; (●) Senecionina en presencia de Atropina. b: (△) Quinidina; (▲) Quinidina en presencia de Atropina. Cada punto corresponde a 10 casos.

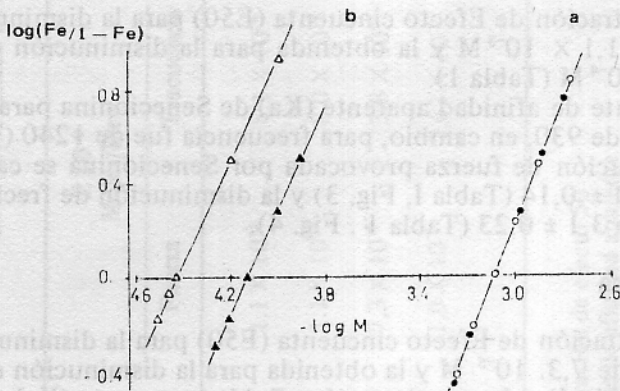


Figura 4.— Gráfico de Hill para la disminución de frecuencia. Intercepto en abscisa corresponde al pD_2 . F_e es la fracción de efecto con respecto a efecto máximo (E/E_{mx}). M: Concentración molar a: (○) Senecionina; (●) Senecionina en presencia de Atropina. b: (△) Quinidina; (▲) Quinidina en presencia de Atropina. Cada punto corresponde a 10 casos.

Los resultados se expresaron como curvas E/E_{\max} vs $\log M$, siendo M la concentración molar de agonista. Para la determinación de los parámetros de unión, es decir, constantes de afinidad y los pD_2 para fuerza y frecuencia, se recurrió a la transformación de las sigmoideas obtenidas en rectas mediante el método de Hill (22) que consistió en graficar $\log Fe/1-Fe$ vs $\log M$ Fig. 3 y 4).

RESULTADOS

Efectos de Senecionina sobre fuerza de concentración y frecuencia cardíaca en aurícula aislada de cobayo.

Senecionina produce una clara disminución de la fuerza contráctil que es dependiente de la concentración en el rango de $7,25 \times 10^{-4}$ a $3,10 \times 10^{-3}$ M (fig. 1a).

Senecionina produce una disminución de la frecuencia cardíaca dependiente de la concentración en un rango de $1,75 \times 10^{-4}$ a $3,1 \times 10^{-3}$ M (fig. 2 a).

Parámetros de medición de los efectos de Senecionina y Quinidina sobre fuerza contráctil y frecuencia cardíaca.

I. Senecionina

La concentración de Efecto cincuenta (E50) para la disminución de fuerza, resultó de $1,1 \times 10^{-3}$ M y la obtenida para la disminución de frecuencia fue de $8,1 \times 10^{-4}$ M (Tabla 1).

La constante de afinidad aparente (K_a) de Senecionina para su efecto sobre fuerza fue de 930, en cambio, para frecuencia fue de 1240 (Tabla I).

La disminución de fuerza provocada por Senecionina se caracteriza por un PD_2 de $3,0 \pm 0,14$ (Tabla I, Fig. 3) y la disminución de frecuencia ocurre con un pD_2 de $3,1 \pm 0,23$ (Tabla I . Fig. 4).

II. Quinidina

La concentración de Efecto cincuenta (E50) para la disminución de fuerza resultó ser de $7,3 \cdot 10^{-5}$ M y la obtenida para la disminución de frecuencia $3,8 \cdot 10^{-5}$ (Tabla I). La constante de afinidad aparente (K_a) de Quinidina para su efecto sobre fuerza fue de 13370 y para frecuencia 26010 (Tabla I).

Quinidina produce una disminución de la fuerza contráctil con un pD_2 de $4,1 \pm 0,20$ (Tabla I Fig. 3) y una disminución de la frecuencia con un pD_2 de $4,4 \pm 0,15$ (Tabla I Fig, 4).

TABLA I

I Parámetros de Senecionina y Quinidina correspondiente a sus efectos sobre fuerza y frecuencia en aurícula aislada de cobayo. II Influencia de Atropina

	E 50 *		K _A **		pD ₂ ***	
	Fuerza	Frecuencia	Fuerza	Frecuencia	Fuerza	Frecuencia
Senecionina	$1,1 \times 10^{-3}$	$8,1 \times 10^{-4}$	930	1240	$3,0 \pm 0,14$	$3,1 \pm 0,23$
Senecion./Atrop.	$1,1 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^{-4}$	886	1258	$3,0 \pm 0,15$	$3,1 \pm 0,13$
Quinidina	$7,3 \times 10^{-5}$	$3,8 \times 10^{-5}$	13370	26010	$4,1 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,15$
Quin./Atropina	$11,0 \times 10^{-5}$	$7,62 \times 10^{-5}$	9070	13110	$4,0 \pm 0,3$	$4,1 \pm 0,13$

* Concentración de efecto 50

** Constante de afinidad aparente

*** Logaritmo negativo de la concentración de efecto 50 (Promedio \pm desviación estándar)

Influencia de Atropina sobre el Efecto farmacológico de Senecionina y Quinidina.

I Senecionina

La concentración de Efecto cincuenta para Senecionina en presencia de atropina para la disminución de fuerza es de $1,1 \times 10^{-3}$ M (Tabla I, Fig. 1 a) y para la disminución de frecuencia fue $8,0 \times 10^{-4}$ M (Tabla I, Fig. 2 a). La constante de afinidad aparente (K_a) en presencia de atropina para su efecto sobre fuerza es 886 (Tabla I, Fig. 3 a) y sobre frecuencia 1258 (Tabla I, Fig. 4 a).

Como se observa en la Fig. 1a y 2a, Senecionina presenta un comportamiento análogo en presencia y ausencia de atropina, tanto para fuerza contráctil como para frecuencia cardíaca.

Con respecto a fuerza el pD_2 para Senecionina es 3.0 ± 0.14 y para Senecionina con atropina pD_2 3.0 ± 0.15 . (Tabla I, Fig. 3 a). El pD_2 de Senecionina en cuanto a frecuencia fue $3,1 \pm 0,23$ y para Senecionina con atropina 3.1 ± 0.13 (Tabla I, Fig. 4 a), obteniéndose en ambos casos un comportamiento análogo.

II Quinidina

La concentración de Efecto cincuenta (E 50) para quinidina en presencia de atropina para la disminución de fuerza fue de $11,0 \times 10^{-5}$ M (Tabla I b) y para la disminución de frecuencia fue $7,62 \cdot 10^{-5}$ M (Tabla I Fig. 2 b).

La constante de afinidad aparente (K_a) en presencia de atropina para su efecto sobre fuerza fue 9070 (Tabla I, Fig. 3-b) y para su efecto sobre frecuencia 13110 (Tabla I 4b).

Los pD_2 de Quinidina referidos para fuerza contráctil son prácticamente iguales pD_2 $4,1 \pm 0.20$ sin atropina y $4.0 \pm 0,30$ en presencia. (Tabla I, Fig. 3 b). Con respecto a frecuencia, se observa que atropina reduce el pD_2 de quinidina de $4,4 \pm 0,15$ a $4,1 \pm 0,13$ (Tabla I, Fig. 4b).

DISCUSION

La disminución de fuerza y frecuencia es dependiente de la dosis de Senecionina en el rango establecido experimentalmente.

Comparando Senecionina y Quinidina frente a fuerza y frecuencia, se observa que las respuestas farmacológicas son cualitativamente semejantes, pero considerando sus pD_2 , se puede concluir que senecionina presenta una actividad significativamente menor que quinidina ($p < 0,001$).

La presencia de atropina no modifica la actividad de senecionina frente a la disminución de fuerza y frecuencia (Tabla I). Esto nos permitiría suponer que en los efectos de senecionina no existirá un componente muscarínico a

diferencia de quinidina cuyo comportamiento es modificado por atropina (Tabla I, Fig. 3b y 4b).

Estos resultados sugieren que aunque la respuesta farmacológica de senecionina y quinidina es semejante frente a fuerza y frecuencia, el mecanismo involucrado no es común a ambos, ya que en el caso de quinidina existe una influencia muscarínica que se advierte claramente frente a atropina. Por otra parte, hay diferencias notables en la potencia inótropa y cronótropa negativas cuyas respuestas son mayores en presencia de quinidina.

Ambas drogas tienen la capacidad de producir efecto máximo para fuerza y frecuencia, como se puede observar en las Figs. 1 y 2. Esto nos permite señalar que senecionina y quinidina tienen igual actividad intrínseca.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Centro de Pesquisas de Productos Naturais-Universidad Federal de Río de Janeiro por la realización del espectro de masa y al Departamento de Química de la Universidad Técnica de Munich Alemania por el espectro de $^{13}\text{CNMR}$.

Este trabajo fue financiado por el Departamento de Desarrollo de la Investigación de la Universidad de Chile.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MONTES, M., y WILKOMIRSKY, T.: Plantas Chilenas en Medicina Popular, Ciencia y Folklore. Universidad de Concepción 46-47 (1977).
- (2) MURILLO A. : Plantes Medicinales du Chili, París (1889).
- (3) ZUÑIGA, E. : Estudios de *Senecio fistulosus*. I. Parte, Tesis Químico Farmacéutico. U. de Concepción (1966).
- (4) MIRANDA, J. B. : Tratado de Farmacia y Farmacología III, 395-398. Soc. Imprenta Lit. Barcelona (Santiago) (1916).
- (5) VIVANCO, L. : Ensayo sobre la Farmacología de la Hualtata. Tesis Médico-Cirujano. U. de Chile (1927).
- (6) MONARDES, G. . Estudio Clínico de la Hualtata en las afecciones cardíacas. Tesis Médico Cirujano. U. de Chile (1928).
- (7) GARAY, L. : Estudio de algunos efectos farmacológicos de *Senecio hualtata*, Tesis Químico Farmacéutico. U. de Chile (1960).
- (8) FUJII, E. Y GARCIA, R. : Estudio sobre efecto de preparaciones de *Senecio fistulosus* sobre la actividad miocárdicas. Tesis Químico Farmacéutico. U. de Chile (1978).
- (9) RUSTOM, J. : Estudio Químico de *Senecio fistulosus*. Tesis Químico Farmacéutico. U. de Chile (1975).
- (10) BULL, L. B., COLVENOR C. C. J. Y DICK, A. T. . The pirrolizidine alkaloids, North-Holland Amsterdam (1968).

- (11) LEONARD, N. J. : The alkaloids MANSKE, R. H. F. y HOLMES, H. L., eds Vol I, cap 4; Vol. V, cap 3. Academic Press, N. Y. (1950-1960).
- (12) CULVENOR, C. C. J., EDGAR, J. A., JAGO, M. V., OUTERIDGE, A., PETERSEN, J. E. y SMITH, L. W. : *Chem. Biol. Interact.* 12, 299 (1976).
- (13) SCHIMMER, O. : Genotoxizität von Pirrolizidinalkaloiden. *Deutsche Apotheker Zeitung* 123, (28) 1361-5 (1983).
- (14) FARNSWORTH, N. R. : Biological and phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* 55, (3) 229 (1966).
- (15) MUNIER, R. : *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35, 1225 (1953).
- (16) THIES, H. Y REUTHER, F. W. : *Naturwissenschaften* 41, 230 (1954).
- (17) ROEDER, H, WLEDENFELD, H., FOST, E. J. : Pirrolizidine alkaloids from *Senecio scargestus*. *Planta Medica* 44(3) 182-183 (1982).
- (18) SEGALL, H. L. Y DALLAS, J. L. : *Phytochemistry* 22 (5) 1271 (1983).
- (19) MOLYNEUX, R. J., ROITMAN, J. N., BENSON, M. Y LUNDIN, R. E.: *Phytochemistry* 21, (2) 439 (1982).
- (20) PEDERSEN, E., LARSEN, E.: *Org. Mass. Spectrometry* 4, 249 (1970).
- (21) VAN ROSSUM, J. M. . Cumulative Dose-Response Curve *Arch. Int. Pharmacodyn* 143, 299(1963)
- (22) GIUDICELLI, J. F. : Calcul des Pax. *J. Pharmacol* (París) 3, 373-380 (1971).