

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Efectos generales y cardiovasculares producidos por los extractos etanólico ,
acuoso y sus fracciones de *Pimenta dioica* (L.) Merrill
en ratas albinas normotensas e hipertensas.

Tesis sometida a consideración de la Comisión del programa de Estudios de
Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar al grado de Magister Scientiae

Adriana Suárez Urhan

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio"

Costa Rica

1995

Dedicatoria

A toda mi familia y en especial
a mi padre quien con su ejemplo
me ha enseñado que nunca es
tarde para aprender.

AGRADECIMIENTOS

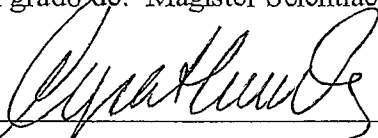
En especial al Dr. Guido Ulate Montero, que con su constante entusiasmo ha sido un estímulo permanente durante el desarrollo de este trabajo.

Al la M.Sc. Mildred García, por formar parte de mi comité de tesis y ofrecer sus consejos en forma oportuna. Al Lic. José F. Ciccio por la preparación química de los extractos y las fracciones utilizadas en esta investigación. Al Dr. Gerardo Mora López, por formar parte del comité de tesis y por su revisión del manuscrito.

Al Dr. Pastrana de la Escuela de Estadística, por su contribución en el análisis de los datos y en especial al señor Franklin Ureña de la sección de Transferencia Informática del Centro de Informática por su paciencia, tiempo y contribución al manejo del programa estadístico SAS.

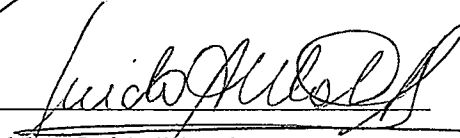
A mis compañeros del Departamento de Fisiología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica y en especial al señor Jorge Arias por su ayuda en el Laboratorio de animal intacto.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de: Magister Scientiae.



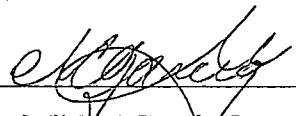
M.Sc. Cyra Hun-Opfer

(En representación de la Decana del SEP)



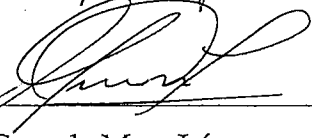
M.Sc. Guido Ulate Montero

(Director de Tesis)



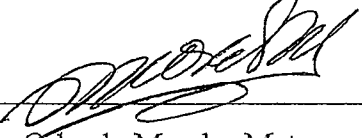
M.Sc. Mildred García González

(Asesor)



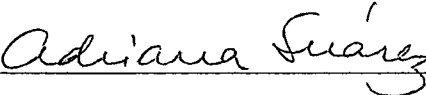
Dr. Gerardo Mora López

(Asesor)



Dr. Orlando Morales Matamoros

(En representación del Director Programa)



Adriana Suárez Urhan

(Candidata)

INDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Hoja de aprobación	iv
Indice	v
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiv
1. Cuerpo del trabajo	
1.1 Cardiovascular Effects of Ethanolic and Aqueous Extracts of <i>Pimenta dioica</i> in Sprague-Dawley rats.	1
1.2 Efectos generales y cardiovasculares de la administración aguda y subaguda de extractos de <i>Pimenta dioica</i> (Myrtaceae) en ratas albinas normotensas e hipertensas.	13
1.3 Hypotensive Action of <i>Pimenta dioica</i> .	28
2. Anexos	
2.1 Anexo A: Revisión de la literatura	44
2.2 Anexo B: Diseño de la investigación	49
2.2.1. Objetivos	49
2.2.2. Hipótesis de trabajo	51
2.2.3. Definición de variables	53
2.2.4. Definición de términos	62

2.3	Anexo C: Ampliación de la metodología	64
	2.3.1. Sujetos experimentales	64
	2.3.2. Preparación de los extractos vegetales	65
	2.3.3. Ensayo Hipocrático	65
2.4	Anexo D: Análisis adicional de resultados	67
2.5	Anexo E: Varios	103
	2.5.1 Tabla de recolección de datos	103
	2.5.2Conclusiones, discusióny recomendaciones	105
2.5	Anexo F: Ampliación de referencias bibliográficas	110

LISTA DE CUADROS

1. Cuerpo del trabajo:

En “Efectos generales y cardiovasculares de la administración aguda y subaguda de extractos de *Pimenta dioica* (Myrtaceae) en ratas albinas normotensas e hipertensas”

Cuadro 1. Efecto máximo de diferentes extractos de *Pimenta dioica* administrados por vía intraperitoneal a ratas conscientes Sprague-Dawley. 26

2. Anexo D:

Cuadro 1. Efecto máximo en el ensayo hipocrático de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* administrada por vía intraperitoneal a ratas conscientes hipertensas espontáneas (SHR) 68

Cuadro 2. Variación de la presión arterial sistólica (mm Hg) en ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*. 69

Cuadro 3. Variación de la presión arterial sistólica (mm Hg) en ratas Sprague-Dawley tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* 70

Cuadro 4. Variación de la frecuencia cardíaca (lat/min) en ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* 71

Cuadro 5. Variación de la frecuencia cardíaca (lat/min) en ratas Sprague-Dawley tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* 72

Cuadro 6. Variaciones en el peso (g) en ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i>	74
Cuadro 7. Variaciones en el peso (g) en ratas Sprague-Dawley tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i>	75
Cuadro 8. Matriz del GLM (Modelo Linear General) comparando la presión arterial sistólica (PAS) de ratas hipertensas espontáneas (SHR) y Sprague Dawley tratadas con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>P. dioica</i> durante 14 días por vía oral	77
Cuadro 9. Matriz del GLM (Modelo linear general) comparando la frecuencia cardíaca de ratas hipertensas espontáneas (SHR) y Sprague Dawley (SDN) tratadas con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>P. dioica</i> durante 14 días por vía oral	78
Cuadro 10. Matriz del GLM (Modelo linear general) comparando el peso de ratas SHR y SDN tratadas con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>P. dioica</i> durante 14 días por vía oral	79
Cuadro 11. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con dosis crecientes de extracto acuoso total de <i>Pimenta dioica</i> administrado por vía endovenosa	80
Cuadro 12. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con la misma dosis (100 mg/kg) del extracto acuoso total y etanólico de <i>Pimenta dioica</i> .	82
Cuadro 13. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con solución salina 0.9 % y propilenglicol al 10 %	83

Cuadro 14. Dosis de las fracciones del extracto acuoso total de <i>pimenta dioica</i> administradas a ratas albinas normotensas Sprague-Dawley por vía endovenosa	85
Cuadro 15. Cambio porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague-Dawley durante 60 minutos posteriores al tratamiento con las diferentes fracciones del extracto acuoso total de <i>Pimenta dioica</i> por vía endovenosa.	86
Cuadro 16. Cambio porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague-Dawley durante 60 minutos posteriores al tratamiento con solución salina 0.9% y propilenglicol al 10% por vía endovenosa.	87
Cuadro 17. Matriz del GLM (Modelo lineal general) comparando la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con las diferentes fracciones del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i> por vía endovenosa	90
Cuadro 18. Efecto sobre la frecuencia cardíaca (lat/min) de ratas albinas normotensas tratadas con dosis crecientes del extracto acuoso total de <i>Pimenta dioica</i> administrado por vía endovenosa ⁹¹	
Cuadro 19. Efecto sobre la frecuencia cardíaca (lat/min) de ratas albinas normotensas tratadas con las diferentes fracciones del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i> por vía endovenosa	92
Cuadro 20. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas con dosis crecientes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i> administrado por vía endovenosa	93
Cuadro 21. Composición iónica del extracto acuoso total de <i>Pimenta dioica</i> al 5 %	95

Cuadro 22. Efecto de la fracción acuosa final de <i>Pimenta dioica</i> , sobre parámetros fisiológicos, en presencia de atropina, administrada intravenosamente en ratas hipertensas espontáneas (SHR)	97
Cuadro 23. Efecto de la fracción acuosa final de <i>Pimenta dioica</i> , sobre parámetros fisiológicos, en presencia de propranolol, administrada intravenosamente en ratas hipertensas espontáneas	98
Cuadro 24. Efecto de la fracción acuosa final de <i>Pimenta dioica</i> , sobre parámetros fisiológicos, en presencia de fentolamina, administrada intravenosamente en ratas hipertensas espontáneas	99

LISTA DE FIGURAS

1.	Cuerpo del trabajo:	Página
	En "Cardiovascular Effects of Ethanolic and Aqueous Extracts of <i>Pimenta dioica</i> in Sprague-Dawley rats"	
	Fig.1 Dose related effect of <i>Pimenta dioica</i> total aqueous extract on the mean blood pressure of normotensive rats.	11
	Fig.2 Effects of fractions of the total aqueous extract on blood pressure of anaesthetized rats.	12
	En "Efectos generales y cardiovasculares de la administración aguda y subaguda de extractos de <i>Pimenta dioica</i> (Myrtaceae) en ratas albinas normotensas e hipertensas"	
	Fig. 1 Variación de la presión arterial sistólica en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de <i>Pimenta dioica</i> .	27
	En "Hypotensive Action of <i>Pimenta dioica</i> "	
	Fig.1 Dose related effects of <i>P.dioica</i> total aqueous extract on the mean blood pressure of normotensive rats and final aqueous fraction on the mean blood pressure of Spontaneously Hypertensive Rats.	40
	Fig.2 Percentage change in mean arterial blood pressure of Sprague-Dawley rats with a fixed dose of each fraction of the total aqueous extract, equivalent in weight of fresh leaves to the ED_{50} of the total aqueous extract.	41
	Fig.3 Effect of α and β adrenergic, cholinergic and autonomic ganglion blockade on mean blood pressure (mmHg) of SHR during 60 minutes after the ED_{50} of the final aqueous fraction of <i>P.dioica</i> was given	42

Fig.4 Effect of α and β adrenergic, cholinergic and autonomic ganglion blockade on heart rate (beats/min) of SHR during 60 minutes after the ED_{50} of the final aqueous fraction of *P.dioica* was given.

2. Anexo D

Fig.1 Variación de la frecuencia cardíaca en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*. Se indica el E.E. para los grupos tratados.

Fig.2 Variación del peso en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferente de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*. Se indica el E.E. para los grupos tratados.

Fig.3 Relación dosis efecto hipotensor del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* administrado por vía intravenosa a ratas albinas normotensas Sprague-Dawley. $n = 6$, promedio \pm E.E.

Fig.4 Disminución porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas tratadas con la misma dosis (100 mg/kg) del extracto acuoso total y etanólico de *Pimenta dioica*

Fig.5 Cambio porcentual de presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague Dawley tratadas con las fracciones n-butanolica y acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

Fig.6 Cambio porcentual de presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague Dawley tratadas con las fracciones en hexano y acetato de etilo del extracto acuoso de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

Fig.7 Relación dosis efecto hipotensor de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* administrado por vía intravenosa en ratas hipertensas espontáneas (SHR). $n = 6$, promedio \pm E.E.

Fig.8 Efecto sobre la presión arterial media de ratas albinas normotensas tratadas con el extracto acuoso total DE ₅₀ de <i>Pimenta dioica</i> y solución iónica con composición similar al extracto acuoso total por vía endovenosa	96
Fig.9 Cambios en la presión arterial media de ratas hipertensas al administrar la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i> en presencia de atropina, propranolol, fentolamina y hexametonio	100
Fig.10 Cambios en la presión arterial media de ratas albinas hipertensas durante los primeros 30 segundos después del tratamiento con la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i> en presencia de atropina, propranolol, fentolamina y hexametonio por vía intravenosa	101
Fig.11 Cambios en la frecuencia cardíaca de ratas albinas hipertensas durante los primeros 30 segundos después del tratamiento con la fracción acuosa final del extracto acuoso de <i>Pimenta dioica</i> en presencia de atropina, propranolol, fentolamina y hexametonio por vía intravenosa	102

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA:	Análisis de variancia.
ECG:	Electrocardiograma.
D.E.:	Desviación estándar.
DE ₅₀ :	Dosis efectiva 50.
E.E:	Error estándar.
FC:	Frecuencia cardíaca en lat/min.
GLM:	General Linear Model, Modelo lineal general.
PAM:	Presión arterial media.
PAS:	Presión arterial sistólica.
SAS:	Statistical analysis system.
SDN:	Ratas albinas normotensas Sprague Dawley.
SEM:	Error estándar de la media.
SHR:	Ratas albinas espontáneamente hipertensas.
SNC:	Sistema nervioso central.

Cardiovascular Effects of Ethanolic and Aqueous Extracts of
Pimenta dioica in Sprague-Dawley rats *

Adriana Suárez ^{*a}, Guido Ulate ^a, José F. Ciccio ^b.

- a. Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, Centroamérica.
- b. Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica, Centroamérica.

ABSTRACT

The hypotensive activity of ethanolic and aqueous extracts of *Pimenta dioica* and several fractions of the aqueous extract was observed in anaesthetized normotensive rats. General effects of the extracts and their fractions were assessed through Hippocratic screening showing a central nervous system (CNS) depressant effect. The intravenous (i.v.) administration of the aqueous extract of *Pimenta dioica* (30, 70, 100 mg/kg) produced dose related significant fall in the mean arterial blood pressure (MAP). The ED₅₀ was 53.94 mg/kg. The hypotensive effect of identical doses (100 mg /kg) of the aqueous extract (95% decrease) was significantly greater ($p > 0.05$) than the effect of the ethanolic extract (67% decrease). The final aqueous fraction produced the greatest hypotensive activity, as compared to the other fractions of the total aqueous extract. There were no significant changes in the heart rate and no abnormalities were observed in the EKG. The mechanisms of action of the extracts have not been determined. Structural elucidation of the compounds responsible for this activity is under investigation.

* Artículo enviado a la revista Journal of Ethnopharmacology para su publicación

Key words: *Pimenta dioica* , hypotensive activity, CNS depressant activity, ethnopharmacology, traditional medicine.

* To whom correspondence is to be addressed.

INTRODUCTION

Allspice, *Pimenta dioica* (L.) Merrill (Myrtaceae family), is a native plant of the West Indies and Central America (Rogers, 1963). Its chief use is as spice and condiment (Grieve, 1971). It is also a well known herbal remedy used in Central America for the treatment of high blood pressure, high blood sugar, obesity and irregular digestion (Vargas, 1990). In the Caribbean it is used in the treatment of menstrual cramps and abdominal pain (Asprey et al., 1953).

Phytochemical studies report no alkaloids and the leaves have tannins and essential oils (Dominguez *et al.*, 1962).

There is no report on the cardiovascular effects of *Pimenta dioica* in the literature.

The purpose of this research was to study the hypotensive activity of ethanolic and aqueous extracts of *Pimenta dioica*. General effects of the aqueous and ethanolic extracts were determined through Hippocratic screening (Malone, Robichaud; 1962).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Pimenta dioica (L.) Merrill was collected in San Joaquín de Flores, province of Heredia during 1993 and 1994. A herbarium specimen (USJ 508060) was deposited at the Herbarium of the University of Costa Rica.

Preparation of the Extracts

Fresh leaves of *P. dioica* (1 kg) were extracted with ten liters of distilled water at 70°C during 20 minutes. The leaves were separated by filtration and the aqueous extract was concentrated to 2400 ml under vacuum at 40°C. Half of this concentrate was lyophilized to obtain 64.26 g of powder (13% yield) which was called aqueous extract. The other half was successively extracted with hexane to obtain 0.36 g (0.072% yield), ethyl acetate (2.9 g, 0.58% yield) and n-butanol (14.75 g, 2.95% yield). The remaining aqueous layer afforded 28.55 g of residue (5.71% yield) which was called the final aqueous fraction.

The ethanolic extract was obtained with 500 g of fresh leaves macerated in 95% ethanol during 72 hours. The extract was filtered, concentrated *in vacuo* to 200 ml and lyophilized to obtain 65.5 g of powder (13.1% yield).

The total aqueous extract and the n-butanol and final aqueous fractions were dissolved in saline solution before i.v. administration to animals. For the ethanolic extract, and the hexane and ethyl acetate fractions a 10% propyleneglycol solution with saline was used.

Hippocratic Screening

Non-fasted female Sprague-Dawley rats were used according to modifications made by Sandberg (1967) to the original method of Malone and Robichaud, in order to eliminate sex as a variable. Two animals were used for each dosage level of the extracts (500, 250, 125 mg/kg). Signs and symptoms induced by the intraperitoneal injections of the extracts were monitored at +5, +10, +15, +30, +60, +120, +240 min. later. Documentation of the observed symptoms were recorded according to the method of Malone and Robichaud (1962).

The tests were carried out at the same time of the day in order to avoid the variability induced by circadian rhythms.

Anesthetized rat experiment

Male albino Sprague-Dawley rats (225-275 g) were used. The animals were anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg 3% w/v). The jugular vein was cannulated with heparinized polyethylene tubing (PE-50) for intravenous injection of plant extracts, while the carotid artery was cannulated and connected to a pressure transducer (Viggo-Spectramed model P 23 XL) and a physiograph (Grass Polygraph model 7H) for blood pressure recording. An EKG (lead II) was taken to monitor heart rate. The trachea was cannulated with a polyethylene tube to facilitate spontaneous respiration.

After a 15 minute equilibration period, the rats were injected intravenously with the plant extracts at concentrations that allowed the application of the desired dose in a volume of 1 ml/kg, or with the same volume of the vehicle. The intravenous injection was made slowly and lasted no more than 30 s. Parameters were recorded continuously during the first five minutes then at 5 minute intervals

during the following ten minutes and finally at 15 minute intervals until one hour was completed after plant extract administration in order to observe how the rats recovered from the effects of the plant extract . Responses were taken as the maximum pressure changes observed immediately after plant extract administration.

Twelve groups of six rats each were treated with a single dose of plant extract or vehicle. The first five groups received 3, 10, 30, 70, 100 mg/kg of the total aqueous extract. A dose-response curve was made and the ED 50 was determined. Group 6 received the ethanolic extract at a dose of 100 mg/kg. Groups 7, 8, 9, 10 were treated with 0.4, 3, 16, 30 mg/kg of the hexane, ethyl acetate, n-butanol and final aqueous fractions respectively (doses are equivalent in weight of fresh leaves to the ED 50 of the total aqueous extract). Groups 11, 12 were controls and received 0.9% saline solution and 10% propyleneglycol respectively.

Statistics

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (\pm SEM). The significance of each plant extract action was assessed using a two-way analysis of variance (ANOVA) and Student's t test. A "p" value of less than 0.05 was considered significant.

RESULTS

Hippocratic Screening

Both the total aqueous and ethanolic extracts caused death of the rats at 250 and 500 mg/kg doses. Death occurred 3 to 24 hours after extract administration. A

central nervous system depressant effect was observed characterized by loss of motor activity, slight analgesia and alarm reaction severely diminished. In all cases the effects were dose dependent.

The final aqueous and ethyl acetate fractions caused death only at a dose of 500 mg/kg, the n-butanol fraction killed the rats at 250 and 500 mg/kg doses and the hexane fractions had no effect. The fractions that killed the rats also had central nervous system depressant effects.

Effects on rat blood pressure

The i.v. administration of the aqueous extract of *Pimenta dioica* (30, 70, 100 mg/kg) produced dose related significant fall in mean arterial blood pressure of anaesthetized normotensive rats. The duration of the hypotension was dose-related. With the 3 and 10 mg/kg doses the mean arterial blood pressure recovered to control values in less than 5 minutes after extract administration. The 30 mg/kg dose caused a hypotensive response that lasted 10 minutes and with the 70 mg/kg dose the mean arterial blood pressure had not recovered after 60 minutes of the extract administration.

The dose-response curve for the total aqueous extract was fitted for linearity ($y = 0.900318x + 1.28308$), with a correlation coefficient $r = 0.9346$. The ED_{50} was 53.94 mg/kg (Figure 1).

Comparing both aqueous and ethanolic extracts at 100 mg/kg, the total aqueous extract has the greatest hypotensive effect (95% decrease of mean blood pressure compared to 67%) on anaesthetized normotensive rats ($p < 0.05$).

The final aqueous fraction had the greatest hypotensive activity compared to the other fractions of the aqueous extract (Figure 2).

There was no significant change in heart rate with the different doses of the total aqueous extract, except with the 100 mg/kg dose which caused bradycardia and death. With the 3, 10, 30 and 70 mg/kg doses, the heart rate observed varied from control values to maximal hypotensive effects. The 100 mg/kg dose of the ethanolic extract changed heart rate significantly from 438±35 to 342±29 beats/min. The fractions of the aqueous extract which produced hypotension did not change heart rate significantly. The n-butanol fraction did not change heart rate and the aqueous fraction changed it minimally. No abnormalities in the EKG were observed.

DISCUSSION

The extracts from the leaves of *Pimenta dioica* possess a hypotensive activity. This activity is greatest in the total aqueous extract compared to the ethanolic extract and the final aqueous fraction.

It has been reported that tannins are common constituents of medicinal plant crude extracts and have pharmacological actions of their own (Joao, et. al.,1986). This could be the case for *P. dioica* whose leaves are rich in tannins.

Tannic acid promotes depressor effects in smooth muscle and cardiac tissues which could mask the pharmacological effects of other active compounds in crude plant extracts. It cannot be ruled out that the hypotensive activity of the extracts maybe due to the presence of tannins in the extracts. The hypotension induced by the extracts was not accompanied by reflex tachycardia. This can reflect a vasodilating action upon vascular smooth muscle and an inhibitory action on the heart. This type of response has been reported with tannic acid (Joao et al., 1986).

In traditional medicine the leaves of *Pimenta dioica* have been used to treat menstrual cramps and abdominal pain. The Hippocratic screening showed a small analgesic effect which could also be explained by the tannin contents of the extracts. Tannic acid inhibits contractions of the isolated rat uterus (Joao et. al.,1986).

The hypotensive activity and the analgesic effects of *P. dioica* may also be related to the central nervous system depressant effect observed with the Hippocratic screening. This effect could be independent of the tannin contents of the extract and be related to other active compounds which cross the blood brain barrier.

To corroborate if the biological effects of the extracts are due to tannins or to other chemical substances, further studies must be made using methods for removing tannins from the extracts.

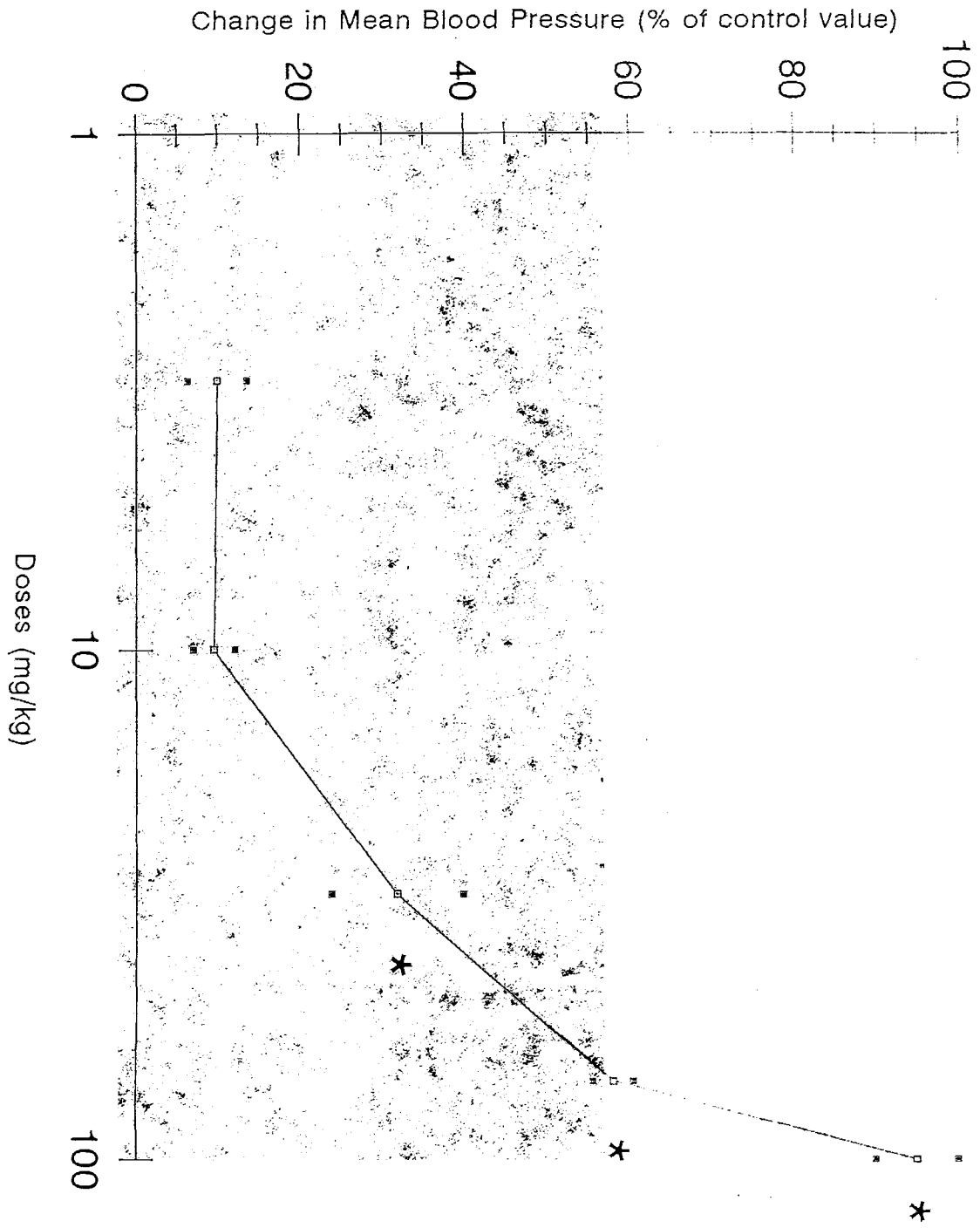
The structural elucidation of the components responsible for these activities and the mechanism of this cardiovascular action are under investigation.

REFERENCES

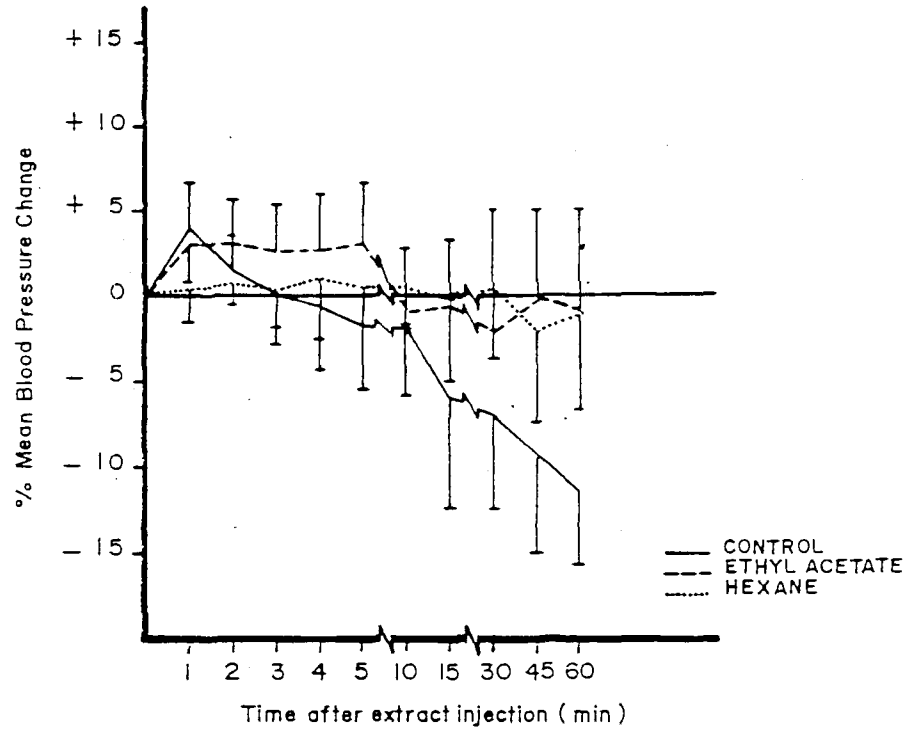
- Asprey G.F., Thornton P. (1953) Medicinal plants of Jamaica. *West Indian Medical Journal* 24,233.
- Domínguez X.A., Rojas P., Garza M.D.R., Córdoba J.A. (1962) Preliminary study of 25 plants from the central territory of Quintana. *Revista Sociedad Química Mexicana* 6,213.
- Grieve M. (1971) *A Modern Herbal*. Dover Publications, New York, p. 19-21.
- João B.C., Mauro N., Giles A.R. (1986) Pharmacologic actions of tannic acid. I. Effects on isolated smooth and cardiac muscles and on blood pressure. *Planta Medica* 32, 32-35.
- Malone M.H., Robichaud R.C. (1962) A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia* 25, 320-332.
- Rogers Mc. (1963) *Fieldiana: Botany* 24, 382.
- Sandberg F., (1967) *Pharmacological Screening of Medicinal Plants*, Government Press, Colombo, Ceylon.
- Vargas S. (1990) *Plantas Medicinales: la naturaleza como guardián de su salud*. MundoGráfico, San José, p.55.

Figure 1. Dose related effect of *Pimenta dioica* total aqueous extract on the mean blood pressure of normotensive rats. Each point represents the mean of 6 observations. Vertical bars denote standard errors of the means (S.E.M.). * $p < 0.05$.

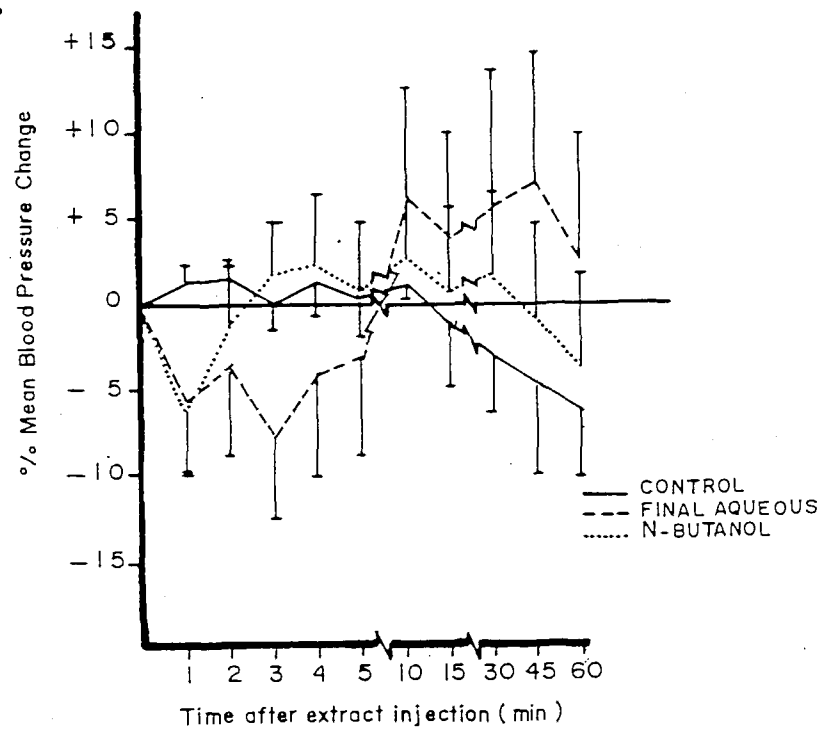
Figure 2. Effects of fractions of the total aqueous extract on blood pressure of anaesthetized rats. * $p < 0.05$. A. Hidrophobic fractions. B. Hidrophilic fractions.



A.



B.



Efectos generales y cardiovasculares de la administración aguda y subaguda de extractos de *Pimenta dioica* (Myrtaceae) en ratas albinas normotensas e hipertensas*

Adriana Suárez Urhan¹, Guido Ulate Montero¹ y José F. Ciccio²

1. Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica.
2. Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

Abstract: The intraperitoneal administration of different extracts of *Pimenta dioica* (L.) Merrill (Myrtaceae) to conscious normotensive and hypertensive rats caused a depression of the central nervous system (CNS). The intensity of this depression depends on the dose. Analgesic and hypothermic effects were also observed. The total aqueous extract was more effective than the ethanolic extract and the final aqueous fraction was the most effective. The peritoneal irritation caused by the extract explains only partially the depressive effect over the CNS. When the final aqueous fraction was given orally to Sprague Dawley (SDN) and spontaneously hypertensive rats (SHR) during 14 days there was no observed change on the systolic blood pressure, heart rate and weight of the animals.

Key words: *Pimenta dioica*, general and cardiovascular effects, Hippocratic screening, traditional medicine.

* Artículo enviado a la revista Biología Tropical para su publicación.

Las plantas se han empleado con fines curativos desde hace varios miles de años (Farnsworth 1985). Recientemente la utilización de la medicina tradicional ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una alternativa económicamente viable para poblaciones de países en desarrollo (Akerele 1988). Es necesario el estudio científico del potencial farmacológico de los extractos vegetales utilizados en la medicina popular y más importante aún valorar su inocuidad (Farnsworth 1989).

Frecuentemente la investigación de los productos naturales se orienta a la búsqueda de una sola actividad biológica específica lo que no permite identificar otras posibles actividades de importancia (Sánchez 1993). Es necesario someter a los extractos de plantas medicinales a un ensayo general inicial donde sea posible identificar el verdadero potencial biológico de los mismos (CYTED 1991). El ensayo hipocrático es una de éstas pruebas iniciales a las que se deben de someter los extractos crudos de plantas (Malone 1962). Este permite detectar actividades biológicas que pueden ser muy diversas, da información toxicológica inicial , orienta sobre qué otras pruebas biológicas se deben efectuar con el extracto y además guía el fraccionamiento químico de este según la actividad biológica de sus fracciones (Sandberg 1987).

La *Pimenta dioica* (L.) Merrill es un árbol que pertenece a la familia Myrtaceae, originario del Caribe y Centroamérica (Rogers 1963) y popularmente conocido en Costa Rica como “Jamaica”. Su principal uso es como especia o condimento (Grieve 1971).

En la medicina popular centroamericana se utilizan las hojas para el tratamiento de la hipertensión arterial, "azúcar en la sangre", obesidad y trastornos digestivos diversos (Vargas 1990). En el Caribe se utilizan en el tratamiento de la dismenorrea y de dolores abdominales (Asprey *et al.* 1953).

Hasta donde se tiene conocimiento no hay informes sobre los efectos biológicos generales *in vivo* ni cardiovasculares de *P. dioica*.

Los objetivos de este trabajo son los siguientes: 1. Describir los efectos biológicos generales de diferentes extractos de hojas de *P. dioica* administrados por vía intraperitoneal en ratas albinas normotensas e hipertensas concientes, 2. Describir los efectos del extracto con mayor actividad biológica sobre la presión arterial sistólica (PAS), la frecuencia cardíaca (FC) y el peso corporal de ratas albinas concientes normotensas e hipertensas al administrarlo oralmente en dos dosis diferentes por un período de catorce días.

MATERIAL Y METODOS

Extractos de plantas: Los extractos se prepararon con las hojas de *P. dioica* recolectadas en San Joaquín de Flores, Heredia, durante los meses de noviembre de 1993 y enero de 1994. Se depositó un ejemplar herborizado en el Herbario de la Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, bajo el número USJ 508060.

Un kilogramo de hojas frescas fue extraído con 10 L de agua destilada a 70 °C durante 20 minutos. Luego se filtró y se concentró al vacío a 40 °C hasta obtener 2.4 L. La mitad de este concentrado fue liofilizado obteniéndose 64.2 g de polvo amarillento, que se llamó extracto acuoso total. La otra mitad del concentrado fue extraído sucesivamente con hexano, acetato de etilo y *n*-butanol, previamente purificados por destilación, para obtener 0.4 g, 2.9 g y 14.8 g respectivamente, quedando un remanente de 28.6 g que se identificó como la fracción acuosa final.

El extracto etanólico se preparó con 500 g de hojas frescas maceradas en etanol 95° durante 72 hr. Luego se filtró y concentró al vacío hasta 200 mL que se liofilizaron obteniendo 65.5 g de extracto seco en forma de sólido amarillento .

El extracto acuoso total, la fracción en *n*-butanol y la fracción acuosa final se disolvieron en solución salina fisiológica para ser administrados por vía intraperitoneal a los animales. El extracto etanólico y las fracciones en hexano y acetato de etilo del extracto acuoso se disolvieron en una solución de propilenglicol al 10% con solución salina.

Para la administración oral de la fracción acuosa final el extracto fue disuelto en agua destilada.

Ensayo hipocrático: Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley (SDN) y

Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) con un peso entre 175 y 275g. El alimento y el agua se retiraron durante las seis horas de observación posteriores a la administración del extracto, después de esto se permitieron *ad libitum*. El extracto se administró intraperitonealmente en diferentes concentraciones, manteniéndose el volumen inyectado alrededor de 0.5 ml. Para cada extracto se inició el estudio con una dosis de 500 mg/kg. Cuando esta dosis resultó letal o mostró una actividad biológica elevada se ensayó con dosis menores hasta encontrar una dosis inefectiva. Para extractos con actividad biológica se inyectaron dos ratas por cada nivel de dosis para un mínimo de seis ratas por extracto y un óptimo de diez. Para los extractos inactivos, se utilizaron dos ratas para 500 y 1000 mg/kg, respectivamente. Además, se realizó el ensayo con ratas control a las cuales se les inyectó el mismo volumen del vehículo en el cual se diluyó el extracto. Se hicieron controles con solución salina 0.9% (p/v) y con propilenglicol al 10%. Se realizaron observaciones a los 5, 15, 30, 60, 90, 120 min, 4, 6, 24 y 48 hr después de inyectada la rata. Los signos y síntomas inducidos por la inyección intraperitoneal de los extractos fueron registrados y calificados según el método de Malone y Robichaud (1962), modificado por Sandberg (1967). En la hoja de registro, los parámetros observados están agrupados en aquellos que indican depresión del sistema nervioso central (SNC), estimulación del SNC, parámetros obtenidos de la observación de los ojos y orejas, efectos generales y efectos subjetivos.

Se realizó una autopsia a todos los animales, ya fuera en el momento de su muerte por efecto del extracto o al finalizar el ensayo. Se hizo una observación macroscópica de los principales órganos (corazón, pulmones, hígado, riñones e intestinos), anotando además la presencia o ausencia de irritación peritoneal.

Administración oral del extracto: Se utilizaron doce ratas adultas machos SDN y doce ratas SHR con un peso inicial entre 200 y 250 g. Los animales se mantuvieron los catorce días que duró el experimento a temperatura ambiente (22-26 °C), con un ciclo

luz-oscuridad de 12:12 horas y fueron ubicados dos animales por jaula en el laboratorio de animal intacto del Departamento de Fisiología de la Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica, recibiendo alimento granulado (Piensos S.A., San José, Costa Rica) y agua potable *ad libitum*.

El número total de la muestra se calculó según la fórmula $n = [(z) (\sigma) / \text{error máximo permitido}]^2$ o sea: $[(1.96)(20) / 8]^2 = 24$; y el diseño experimental consistió en un modelo de bloques completos aleatorizados. Para cada tipo de rata (normotensas e hipertensas), se hicieron tres grupos de cuatro ratas cada uno. A un grupo se le dio agua destilada (0.1 ml/ 100 g de peso corporal) dos veces al día, y a los otros dos grupos se les administró la fracción acuosa final del extracto acuoso de *P. dioica* en dos dosis diferentes: 140 y 280 mg/kg por día , divididas en dos administraciones diarias (8:00 a.m. y 5:00 p.m.) durante catorce días. La administración del extracto y del agua destilada fue *per os*, utilizando una cánula metálica intragástrica (16G x 3).

Los siguientes parámetros fueron medidos en el séptimo, décimo y último día del experimento: peso (g), presión arterial sistólica (PAS)(mmHg) y frecuencia cardíaca (FC) (lat/min).

Para la medición de la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca se utilizó un manguito inflable y un micrófono colocados en la cola de los animales, ambos conectados a un polígrafo fisiológico marca NARCO BIO System Inc.

Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar. Se realizó un GLM (*General Linear Model*), utilizando el paquete estadístico SAS (Statistical analysis system, SAS Institute Inc.) para analizar la influencia de los diferentes tratamientos y tipos de rata sobre los parámetros: peso, frecuencia cardíaca y presión arterial sistólica. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Ensayo hipocrático: Los resultados del ensayo hipocrático en las ratas normotensas, según el tipo de extracto y dosis administrada se resumen en el cuadro 1. Las ratas inyectadas con la fracción extraída con hexano, no presentaron cambios fisiológicos importantes. El resto de las fracciones produjeron signos y síntomas semejantes: disminución de la actividad motora, pérdida del reflejo de enderezamiento, analgesia, pérdida de la actividad prensil, especialmente en miembros traseros, pérdida de la reacción de alarma e hipotermia. En todos los casos los signos fueron dosis-dependientes y la duración e intensidad de los signos disminuía cuando la dosis del extracto se hacía más pequeña. La dosis letal estuvo entre 125 y 250 mg/kg para el extracto acuoso total, el extracto etanólico y la fracción en *n*-butanol; para la fracción en acetato de etilo y la fracción acuosa final estuvo entre 250 y 500 mg/kg. En todas las autopsias de los animales que murieron por efecto del extracto se observó, como único hallazgo positivo, una irritación peritoneal importante, caracterizada por congestión venosa y la presencia de líquido intraperitoneal. No se observó daño macroscópico en los principales órganos. En las autopsias realizadas al finalizar el ensayo, no se encontraron datos patológicos.

El extracto etanólico no presentó un efecto analgésico tan marcado como el extracto acuoso total. La fracción acuosa final provocó signos y síntomas como disminución de la actividad motora, pérdida del reflejo de enderezamiento, analgesia, pérdida de la actividad prensil, pérdida de la reacción de alarma y disminución de la temperatura rectal a la dosis de 250 mg/kg sin causar la muerte de los animales.

Al dar, por vía intraperitoneal, la fracción acuosa final a ratas SHR en dosis de 500, 250 y 125 mg/kg, se observó que tanto 250 como 500 mg/kg fueron letales para todos los animales. Con 500 mg/kg, la respuesta se inicia a los 15 min de administrado el

extracto, con disminución progresiva de la actividad motora y analgesia similares a las observadas en ratas SDN. Sin embargo, la disminución y pérdida del reflejo de enderezamiento, de los reflejos corneal y pineal, la pérdida de la actividad prensil, pérdida de la reacción de alarma, la palidez y cianosis fueron menos evidentes en las ratas SHR.

Con la dosis de 250 mg/kg los signos observados durante las primeras 6 horas fueron escasos, a pesar de que todos los animales murieron antes de 24 hr. Se observó una leve disminución de la actividad motora y disminución de la temperatura rectal, lo cual fué evidente con todas las dosis. Con 125 mg/kg, sólo se observó una leve disminución de la actividad motora. En la autopsia de las ratas que murieron por efecto del extracto, se observó irritación peritoneal con presencia de líquido intraperitoneal. En otros órganos no se observaron lesiones. Las autopsias realizadas a las 48 hr no presentaron datos patológicos.

En las ratas controles a las cuales se les inyectó solución salina al 0.9% p/v y propilenglicol al 10% no se observaron signos de ningún tipo de actividad. Sí se observó una leve disminución de la temperatura rectal que en promedio fué de 1.2 °C. En las autopsias no se encontraron signos patológicos.

Administración oral del extracto: Los cambios en la PAS durante las dos semanas en que se administró oralmente la fracción acuosa final, se muestran en la Figura 1. A lo largo de este período todas las ratas presentaron un incremento de las cifras de P.A.S., y esta tendencia no fue modificada por la administración de dicha fracción. La administración de la fracción no causó en ningún momento diferencias significativas en la PAS entre los grupos tratados y el grupo control en ninguno de los dos tipos de rata y en ninguna de las dosis. Claramente se observó que los dos tipos de rata manejaban valores de PAS diferentes ($p < 0.05$) lo que no se alteró por la administración del extracto. En todo momento las cifras de PAS de las ratas SHR fue mayor que la de ratas SDN ($p < 0.05$).

La FC fue siempre mayor en las ratas SHR que en las ratas SDN ($p < 0.05$) excepto por la FC a los 14 días de tratamiento donde no hubo diferencia según el tipo de rata. La administración del extracto en dos dosis diferentes no provocó cambios en la FC de los grupos tratados comparados con el grupo control en ninguno de los dos tipos de rata. Las diferencias en FC entre los dos tipos de rata no se debieron al tratamiento con el extracto.

La evolución del peso corporal durante los 14 días de tratamiento mostró una clara tendencia hacia la ganancia de peso. La administración del extracto no provocó diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en ninguna de las dos dosis administradas y en ninguno de los dos tipos de ratas. El peso de las ratas SHR siempre fue menor que el de las SDN ($p < 0.05$) sin que influyera en esto la administración del extracto.

DISCUSION

El ensayo hipocrático es una prueba multidimensional utilizada al inicio del estudio de extractos de plantas medicinales para detectar actividades biológicas diversas, orientar el fraccionamiento fitoquímico y decidir sobre la utilización de pruebas más específicas según los resultados obtenidos (CYTED 1991). En el presente ensayo se observó que tanto el extracto acuoso total, como el extracto etanólico, causaban signos dosis-dependientes de disminución de la actividad motora, pérdida de los reflejos de enderezamiento, corneal y pineal, pérdida de la reacción de alarma y analgesia. Estos efectos sugieren una actividad depresora del sistema nervioso central, presente en los dos tipos de extracto. Sin embargo, la actividad analgésica fué más marcada en el extracto acuoso total y la pérdida de la reacción de alarma también fué mayor. Con los dos extractos se observó midriasis y palidez de las orejas lo que sugiere una activación del sistema nervioso simpático. La pérdida de la actividad prensil sugiere alteraciones del tono muscular esquelético. La cianosis pre-mortem puede explicarse por trastornos de la función pulmonar probablemente por la depresión del SNC y la pérdida del tono

muscular. La presencia de un efecto analgésico, en ambos extractos, coincide con su uso en la medicina popular para el tratamiento de dolores abdominales (Asprey *et al.* 1953). El trauma de la inyección intraperitoneal, con la irritación peritoneal ocasionada por el extracto, podría explicar parte de la disminución de la actividad motora y de la pérdida del reflejo de enderezamiento, pero no explica la totalidad de signos que indican depresión del SNC.

Por ser más efectivo, el extracto acuoso total fué fraccionado encontrándose que la actividad biológica se pierde o disminuye mucho en ciertas fracciones (hexano y acetato de etilo) y permanece casi intacta en otras (fracción acuosa final y *n*-butanol).

La fracción acuosa final del extracto acuoso fué tan efectiva como el extracto acuoso total a la dosis de 500 mg/kg e inclusive causó una mayor pérdida del reflejo de enderezamiento. Los efectos observados con esta fracción también fueron dosis dependientes. La fracción en *n*-butanol se comportó de manera similar, pero a 250 mg/kg presentaba un 100% de mortalidad, lo que no se observó con la fracción acuosa final, a pesar de que sí se observaron una gran variedad de signos de actividad biológica. Todo esto hace pensar que la fracción acuosa final del extracto acuoso es la más rica en las sustancias biológicamente activas y es ésta la fracción que debe ser mejor estudiada.

El efecto depresor del SNC podría estar implicado en el efecto terapéutico atribuido por la medicina popular a la planta cuando es utilizada en el tratamiento de la hipertensión arterial (Vargas 1990). Sin embargo, al administrarse durante 14 días por vía oral, la fracción acuosa final en dosis de 140 y 280 mg/kg no tiene efecto alguno sobre la presión arterial sistólica, lo que no coincide con el uso popular de la planta. Esto se puede deber a muchas razones, dentro de las cuales se puede mencionar el hecho de que la sustancia biológicamente activa tenga una función selectiva dentro del SNC y no afecte a los centros de regulación cardiovascular, por lo que no altera la presión arterial. Además, no se puede descartar que la vida media de la sustancia biológicamente activa sea muy corta y que la dosificación tenga que realizarse en forma más frecuente.

Se nota que todos los extractos y fracciones provocan una disminución de la temperatura rectal. Esta es una acción biológica no esperada ya que en la literatura consultada (NAPRALERT 1992) no hay reporte alguno sobre su uso como antipirético. Se sugieren estudios posteriores dirigidos a esclarecer esta acción.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Norman R. Farnsworth (College of Pharmacy of the University of Illinois at Chicago) por su gentileza al permitirnos el acceso a la base de datos NAPRALERT. A Jorge Gómez-Laurito (Escuela de Biología, U.C.R.) por realizar la clasificación de la especie. A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto No. 422-93-243) y al CYTED (Proyecto X-1) por el apoyo brindado.

RESUMEN

La administración por vía intraperitoneal, de diferentes extractos de *P. dioica* a ratas albinas normotensas e hipertensas concientes, causó una depresión del SNC. La intensidad de esta depresión dependió de la dosis. También se observó un efecto analgésico e hipotérmico. Con el extracto acuoso total se vió una mayor actividad biológica que con el extracto etanólico y la fracción acuosa final del extracto acuoso fue la que mostró la mayor actividad biológica de las fracciones. La irritación peritoneal causada por el extracto explica sólo en parte la acción depresora del SNC. Al administrar por vía oral la fracción acuosa final del extracto acuoso a ratas SDN y SHR, durante 14 días, no se vió efecto alguno sobre la presión arterial sistólica, la frecuencia cardíaca y el peso corporal.

REFERENCIAS

- Akerele, O. 1988. Medicinal Plants and Primary Health Care: an agenda for action. *Fitoterapia* 59: 355-363.
- Asprey, G.F.& P. Thornton 1953. Medicinal Plants of Jamaica. Part I. *West Indian Med. J.* 24: 233-252.
- CYTED. 1991. Reunión anual de la Red Iberoamericana de Productos Naturales de Uso Medicinal. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Sao Paulo, Brasil. p. 15-19.
- Farnsworth, N.R. 1985. La medicina moderna y las plantas: un encuentro entre la ciencia y el folklore. *Foro Mundial de la Salud.* 6: 89-94.
- Farnsworth N.R., O. Akerele, A.S. Bingel, D.D. Soejarto & Z. Guo. 1989. Las plantas medicinales en la terapéutica. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.* 107: 314-329.
- Grieve M. 1971. *A Modern Herbal.* Dover Publications, New York. p.19-21.
- Malone, M.H.& R.C. Robichaud. 1962. A Hippocratic Screen for Pure or Crude Drug Materials. *Lloydia.* 24:320-332.
- Napralert. 1992. *Natural Products Alert.* University of Illinois.

Rogers Mc. 1963. Flora de Guatemala . Fieldiana ,Botany 24:382-385.

Sánchez ,C., M.Gupta, M.Vásquez, Y.M.Noriega & G. Montenegro 1993. Bioensayo con *Artemia salina* para predecir la actividad antibacteriana y farmacológica. Revista Médica de Panamá 18:62-69.

Sandberg, F. 1967. Pharmacological Screening of Medicinal Plants. Government Press, Colombo, Ceylon. p 1-15.

Sandberg, F. 1987. The Integrated Natural Products Research in the Development of Plant-derived Pharmaceuticals. Fitoterapia. 57: 309-313.

Vargas, S. 1990. Plantas medicinales: la naturaleza como guardián de su salud. Mundo Gráfico, San José. 55p.

Cuadro 1. EFECTO MAXIMO DE DIFERENTES EXTRACTOS DE PIMENTA DIOICA ADMINISTRADOS POR VIA INTRAPERITONEAL A RATAS CONCIENTES SPRAGUE-DAWLEY

Extracto	Dosis mg/kg	Disminución actividad motora	Pérdida reflejo enderezamiento	Analgesia	Pérdida reflejo corneal y pineal	Pérdida actividad prensil	Pérdida reacción alarma	Tamaño pupila (mm)	Palidez	Cianosis	Disminución temperatura rectal °C	Otros signos
Acuoso Total	500	+3	+3	+2	+1	+4	+4	4	+2	+2	3.8	Mortalidad 100% 3-5 hr
	250	+2	+1	+2	0	+3	+3	2	+1	+1	3.4	Mortalidad 100% 6-24 hr
	125	+1	0	+1	0	0	+1	2	0	0	2.4	
	50	+1	0	0	0	0	0	2	0	0	3.2	
	10	0	0	0	0	0	0	1.5	0	0	2.2	
Etanol	500	+3	+3	+1	+1	+4	+3	3	+1	+1	3.2	Mortalidad 100% 4-6 hr
	250	+2	+2	+1	0	+1	0	2	+1	0	3.7	Mortalidad 100% 6-24 hr
	125	+2	0	0	0	0	0	2	0	0	2	
Hexano	500	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2.6	
Acetato de etilo	500	+2	0	+1	0	0	0	2	+1	0	3.7	Mortalidad 100% 6-24 hr
	250	+1	0	0	0	0	0	1	0	0	2.9	
	125	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2.8	
n-butanol	500	+3	+2	+1	0	0	0	3	+1	0	2.3	Mortalidad 100% 4-24 hr
	250	+3	+2	+1	0	0	0	3	0	0	3.4	Mortalidad 100% 6-24 hr
	125	+1	0	0	0	0	0	2	0	0	3.0	
Acuoso final	500	+3	+4	+2	+1	+4	+4	3.5	+1	+2	3.5	Mortalidad 100% 4-24 hr
	250	+3	+1	+1	0	+3	+1	2.5	+1	0	4.5	
	125	+1	0	+1	0	0	0	1.0	0	0	1.5	
Control		0	0	0	0	0	0	1.0	0	0	1.2	

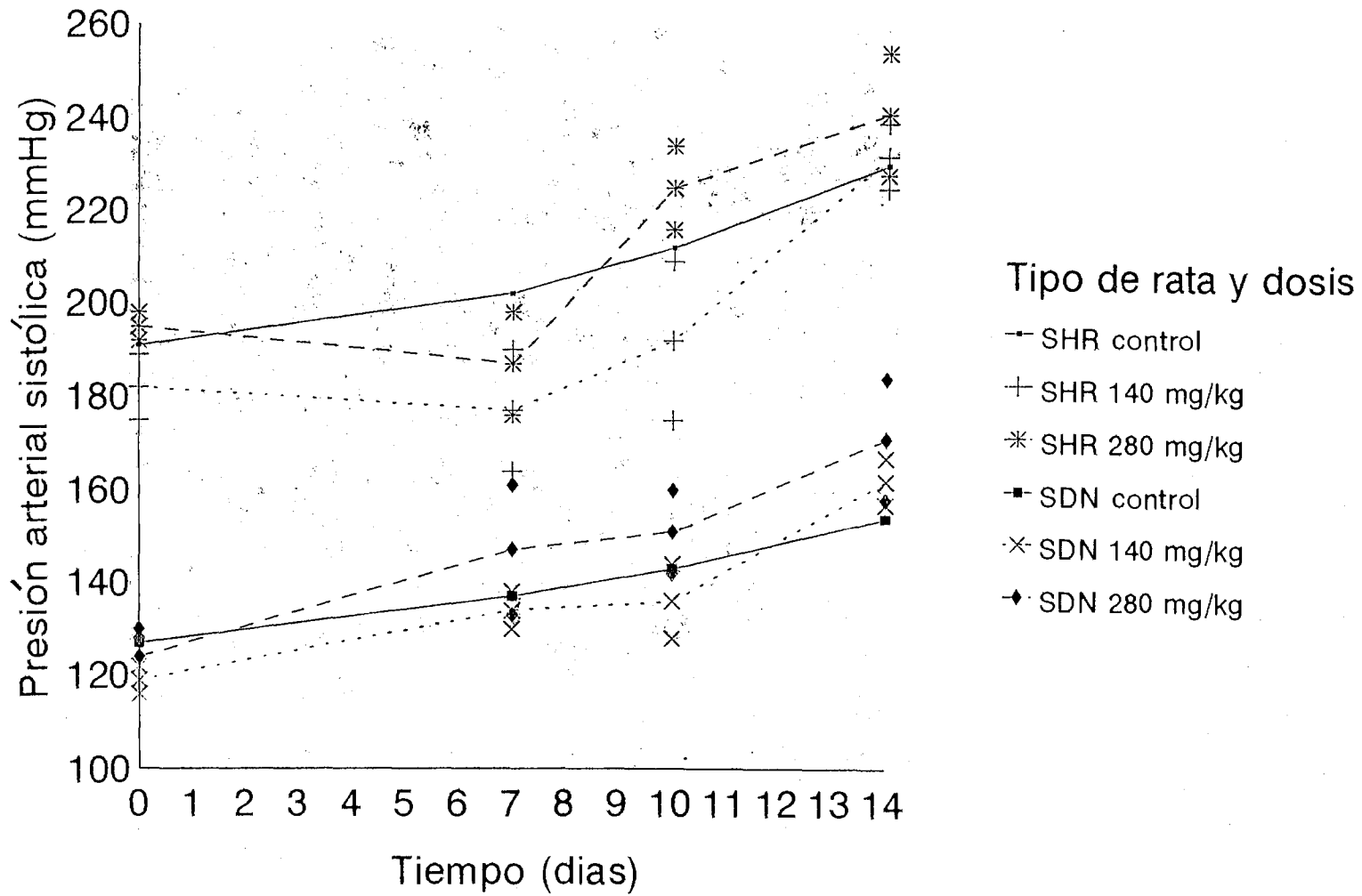


Fig.1 Variación de la presión arterial sistólica en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*. Se indica el E.E. para los grupos tratados.

Hypotensive Action of *Pimenta dioica* *

Adriana Suárez^{1,3}, Guido Ulate¹, José F. Ciccio²

1. Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.
2. Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.
3. Address for correspondence.

Abstract: The hypotensive action of an aqueous extract of *Pimenta dioica* in Sprague-Dawley rats was studied. It produced a dose dependent decrease in blood pressure and the ED₅₀ was 54 mg/kg. Four fractions of the total aqueous extract were tested in Sprague-Dawley rats and the final aqueous one had the greatest hypotensive effect. The antihypertensive action of the final aqueous fraction of the aqueous extract of *P. dioica* in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) was studied. It produced a dose dependent decrease in blood pressure and the ED₅₀ was 45 mg/kg. This antihypertensive effect could not be ascribed to the ionic composition of the extract. In pharmacological antagonist studies, the antihypertensive effect of the final aqueous fraction in SHR was not mediated via α , β adrenergic, muscarinic or autonomic ganglion receptors. An initial inespecific bradycardia was observed which does not seem responsible for the hypotensive effect of the extract since it was also present in a group of rats that only received 0.9% saline solution. Peripheral vasodilation may be the cause of the extract effect. A direct effect of the extract on vascular smooth muscle could be involved.

* Artículo enviado a la revista Planta Medica para su publicación.

Key Words: *Pimenta dioica*, traditional medicine, herbal medicine, antihypertensive effect, arterial hypertension.

INTRODUCTION

Pimenta dioica (L.) Merril (Myrtaceae family) is a tree native of the West Indies and Central America¹. The dried unripe berries are used mainly as spice and condiment². They are also used for flatulent indigestion, as a febrifuge and are considered to have tonic and antihelmintic properties³. The leaves of this tree, known popularly as "jamaica", have been used in Costa Rican folk medicine as an antihypertensive⁴.

Phytochemical studies show the presence of essential oils and tannins in both the berries and the leaves. Alkaloids are absent⁵.

In the literature there is no report on the cardiovascular effects of *Pimenta dioica*.

The total aqueous extract of *P. dioica* was used to characterize the hypotensive activity of the plant in Sprague-Dawley normotensive rats (SDN). Several fractions of the aqueous extract were also utilized for the same purpose and the most potent or effective fraction was used in spontaneously hypertensive rats (SHR) to study the mechanisms involved in the blood pressure effects of the extract.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Preparation of Extracts

The leaves of *P. dioica* (L.) Merril were collected in the province of Heredia during 1993 and 1994. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of the

University of Costa Rica (USJ 508060).

The fresh leaves (1000 g) were extracted with ten liters of distilled water at 70° C during 20 minutes. The extract was filtered and concentrated to 2400 ml under vacuum at 40° C. Half of this concentrate was lyophilized to obtain 64.26 g of powder (13% yield) which was called total aqueous extract. The other half was successively extracted with hexane, ethyl acetate and *n*-butanol to give 0.36 g (0.072% yield), 2.90 g (0.58% yield) and 14.75 g (2.95% yield) respectively. After evaporation of the solvents, the final aqueous fraction, was lyophilized to give 28.55 g (5.71% yield).

The total aqueous extract, *n*-butanol and final aqueous fraction were dissolved in 0.9% saline solution before intravenous administration to animals. For the hexane and the ethyl acetate fractions a 10% propyleneglycol solution with saline was used.

Anaesthetized Rats

- a) Male SDN rats weighing between 225 and 275 g were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg). The trachea was cannulated with a polyethylene tube to secure adequate ventilation. The right carotid artery was cannulated with a heparinized polyethylene tubing PE-50 which was connected to a pressure transducer (Viggo-Spectramed model P23 XL) and a polygraph (Grass model 7H) for blood pressure recording. The right jugular vein was also cannulated for intravenous injection. An EKG (Lead II) was registered to calculate heart rate.

After a 15 min period of equilibration, increasing doses of the total aqueous extract or a fixed dose of the fractions equivalent in weight of fresh leaves to the ED₅₀ of the total aqueous extract (0.4, 3.0, 16.0, and 30.0 mg/kg of hexane, ethyl acetate, *n*-butanol and final aqueous fractions respectively) were

given to groups of six rats each. Parameters were recorded continuously during the first five minutes after plant extract administration and then at 5 minute, and 15 minute intervals for one hour. Responses were taken as the maximum pressure changes observed during this period. A dose-response curve was made for the total aqueous extract.

The fraction of the total aqueous extract that was most effective in lowering the mean blood pressure in SDN rats was tested in SHR in the same way as described above. Increasing doses (10, 30, 44, 62, 100 mg/kg) were given, a dose response curve was also made and the ED_{50} was used in pharmacological antagonist studies.

- b) Ionic composition of the total aqueous extract. The K^+ , Ca^{++} , Na^+ and Mg^{++} contents of the total aqueous extract were estimated by atomic absorption spectrometry. A solution containing KCl, NaCl, $CaCl_2$ and $MgCl_2$ equivalent to the ion contents present in a dose of 50 mg total aqueous extract/kg was injected to six SDN anaesthetized rats to verify the effect of these ions on their blood pressure.
- c) Pharmacological antagonist studies. To study the possible antihypertensive mechanism of the extracts of *P.dioica*, four groups of six SHR each were prepared for experimentation as outlined above but, autonomic ganglion (group 1), α -adrenoceptor (group 2), β -adrenoceptor (group 3) and cholinergic receptor (group 4) blockades were produced by using a specific blocker (group 1: hexamethonium 20 mg/kg, group 2: phentolamine 2 mg/kg, group 3: propranolol 0.4 mg/kg and group 4: atropine 1 mg/kg). The effectiveness of the receptor blockade was tested by injecting an agonist in an effective dose, then the specific antagonist was given and when the blood pressure was stabilized, the same dose of the agonist was given again. If the agonist's action was blocked, evidenced by changes in mean arterial blood pressure smaller than

5%, a test dose of the final aqueous fraction (45 mg/kg) was then given immediately. Methoxamine (50 ug/kg), isoproterenol (0.5 ug/kg) and acetylcholine (1 ug/kg) served as the α , β and cholinergic agonists respectively. The four groups were compared to a group of six SHR that only received the final aqueous fraction (ED_{50} : 45 mg/kg). This was the control group. A last group received an equivalent volume of 0.9% saline solution.

Drugs

The following drugs were used: Acetylcholine chloride (Merck), Phentolamine methanesulfonate (CIBA Geigy), methoxamine hydrochloride (Burroughs Wellcome Co.), isoproterenol hydrochloride (Sigma), propranolol hydrochloride (Sigma), atropine (Sigma) and hexamethonium chloride (K& K Laboratories, Inc.).

Statistics

All values were expressed as mean \pm SEM. Blood pressure values obtained with the different doses of the extracts, the different fractions of the total aqueous extract and the group that received the ionic solution, were compared by analysis of variance (ANOVA). To verify the effect of the blockers used in the pharmacological antagonist studies, a paired t-test was used and for the comparison of the different blocked groups, a General Linear Models Procedure was applied using SAS. The level of significance was defined at $p < 0.05$.

Results

a) *Dose-Response Curves*

The intravenous administration of increasing doses of the total aqueous extract of *P. dioica* (3, 10, 30, 70, and 100 mg/kg) produced a dose related significant fall in the mean arterial blood pressure of anaesthetized normotensive rats. The DE 50 was 54 mg/kg (Fig.1). The duration of the hypotension was dose related. With the 3 mg/kg and 10 mg/kg doses the mean arterial blood pressure recovered to control values in less than 5 minutes after extract administration. The 30 mg/kg dose caused a hypotensive response that lasted 10 minutes and with the 70 mg/kg dose the mean arterial blood pressure had not recovered 60 minutes after the administration of the plant extract.

Of the four fractions of the total aqueous extract that were tested, the final aqueous one had the greatest hypotensive effect ($p < 0.05$) (Fig.2).

When the increasing doses of the final aqueous fraction were given intravenously to anaesthetized spontaneous hypertensive rats a dose related significant fall in mean arterial blood pressure was observed. The ED₅₀ was 45 mg/kg. (Fig. 1).

For all the extracts tested, there was no significant change in heart rate except with the 100 mg/kg dose which caused bradycardia and death. No abnormalities in the EKG were observed.

b) *Effect of the ionic composition of the total aqueous extract.*

The K⁺, Ca⁺⁺, Na⁺ and Mg⁺⁺ contents were 30, 4.3, 1.1 and 3.3 mg/g of the total aqueous extract respectively. The intravenous injection of a solution containing KCl, NaCl, CaCl₂ and MgCl₂ equivalent to the ion contents present

in the total aqueous extract, did not produce significant changes in mean arterial blood pressure of SDN anaesthetized rats and the effect was never different from the one observed with plain 0.9% saline solution.

c) *Pharmacological antagonist studies*

Atropine, propranolol and phentolamine which blocked the effects of acetylcholine, isoproterenol and methoxamine respectively, did not affect the hypotensive effect of the extract. When hexamethonium was given, the hypotensive response to the extract was diminished in a significant way ($p < 0.05$) (Fig 3).

To simplify the understanding of the results, the changes in mean blood pressure and heart rate were analyzed in three different periods of time after extract administration. Immediate changes observed during the first minute, the period between the first and fifth minute and a later 55 minute time lapse that ends 60 minutes after extract administration.

The first 30 seconds after extract administration were carefully examined and every five seconds the mean blood pressure decreased an average of 5, 9, 10, and 5 mmHg for the phentolamine, propranolol, atropine and hexamethonium blocked groups respectively. There was no significant difference between the groups or between them and the control group. Heart rate also decreased but again there was no significant difference between the groups or between the groups and the control or the 0.9% saline solution group.

In all the groups, the greatest change in mean blood pressure was observed at the end of the first minute after extract administration (Fig.3) and at this time, all the groups presented a decrease in heart rate which was not significantly different between them (Fig.4).

The control group showed the greatest hypotension during the third minute after extract administration. After this, the mean blood pressure showed a recuperating tendency until the end of the sixty minute observation period.

Between the first and the fifth minute after extract administration, only the hexamethonium group failed to show the hypotensive effect of the extract in a significant way ($p < 0.05$) (Fig.3).

Heart rate, after the initial first minute bradycardia, did not decrease any more and the general trend was to increase in all the groups to maximum values around the fifth to tenth minute after extract administration. The propranolol group always had significantly lower heart rates (Fig.4).

Between five minutes and the end of the observation period, in all the groups the mean blood pressure showed a recuperating tendency associated with reflex tachycardia. The propranolol group always had significantly ($p < 0.05$) lower mean blood pressures between 5 and 60 minutes after extract administration, and it was not before 15 minutes that a clear recuperating tendency of the blood pressure was observed. The other groups started the recuperation process earlier and reached higher pressures at the end of the 60 minutes in a similar way to the control group (Fig.3). At the end of the sixty minutes, none of the groups had recovered mean blood pressure to control levels.

Heart rate recovered completely at the end of 60 minutes in the control group and in the hexamethonium group. The propranolol group had difficulties in recuperating heart rate and at the end of the observation period had a significant bradycardia ($p < 0.5$).

DISCUSSION

The aqueous extract of *P. dioica* administrated i.v. has a dose related hypotensive effect on SDN rats which lasts longer as the dose increases. When the total aqueous extract was successively extracted, the fraction with the greatest hypotensive effect was the final aqueous one. This favors the fact that the hypotensive causing compound is hydrophylic.

The final aqueous fraction has a dose related hypotensive effect on SHR. The ED₅₀ is smaller (45 mg/kg) than the ED 50 for the total aqueous extract on SDN rats (54 mg/kg). This could be due to the fact that the antihypertensive compound is more concentrated in the fraction than in the total aqueous extract.

The hypotensive action of the final aqueous extract was not mediated through cholinergic, α or β adrenergic receptors. Atropine, phentolamine and propranolol which almost completely blocked the effects of acetylcholine, methoxamine and isoproterenol respectively, did not affect the depressor effect of the extract.(Fig.3).

When hexamethonium was given, the hypotensive response to the extract was diminished in a significant way ($p < 0.05$) (Fig.3), this means that the autonomic ganglion blockade diminished the hypotensive effect of the extract.

The initial bradycardia observed during the first minute after extract administration is probably due to non-specific factors because it was seen in all groups including the control group and in a group that just received 0.9% saline solution. A direct inespecific effect on the heart could be the cause. The intravenous injection in the yugular vein of a solution at room temperature could explain this bradycardia⁶. The bradycardia does not seem responsible for the hypotensive effects of the extract because the animals that received 0.9% saline solution presented it without hypotension.

Peripheral vasodilation may be the cause of the extract effect. The extract may present a vasorelaxing activity which could not be evident after autonomic ganglion blockade due to the extreme vasodilation present prior to extract administration. Probably, for the same reason, the phentolamine treated group presented less hypotension although the difference with the control group was not significant. A direct effect of the extract on the vascular smooth muscle could be involved. It has been described⁷ that tannic acid may cause hypotension in rats due to nonspecific depressor effects in vascular smooth muscle and *P. dioica* is a tannin-rich plant⁵.

This reduction in blood pressure may also be due to non-specific factors other than the active principles present in the extract. Data show that the depressor effect of *P. dioica* is independent of the amount of K^+ , Ca^{++} , Na^+ or Mg^{++} ions in the total aqueous extract.

The extract does not seem to affect the capacity of the heart to increase heart rate in order to compensate after the initial hypotension. Only very large doses of the extract cause persisting bradycardia and death.

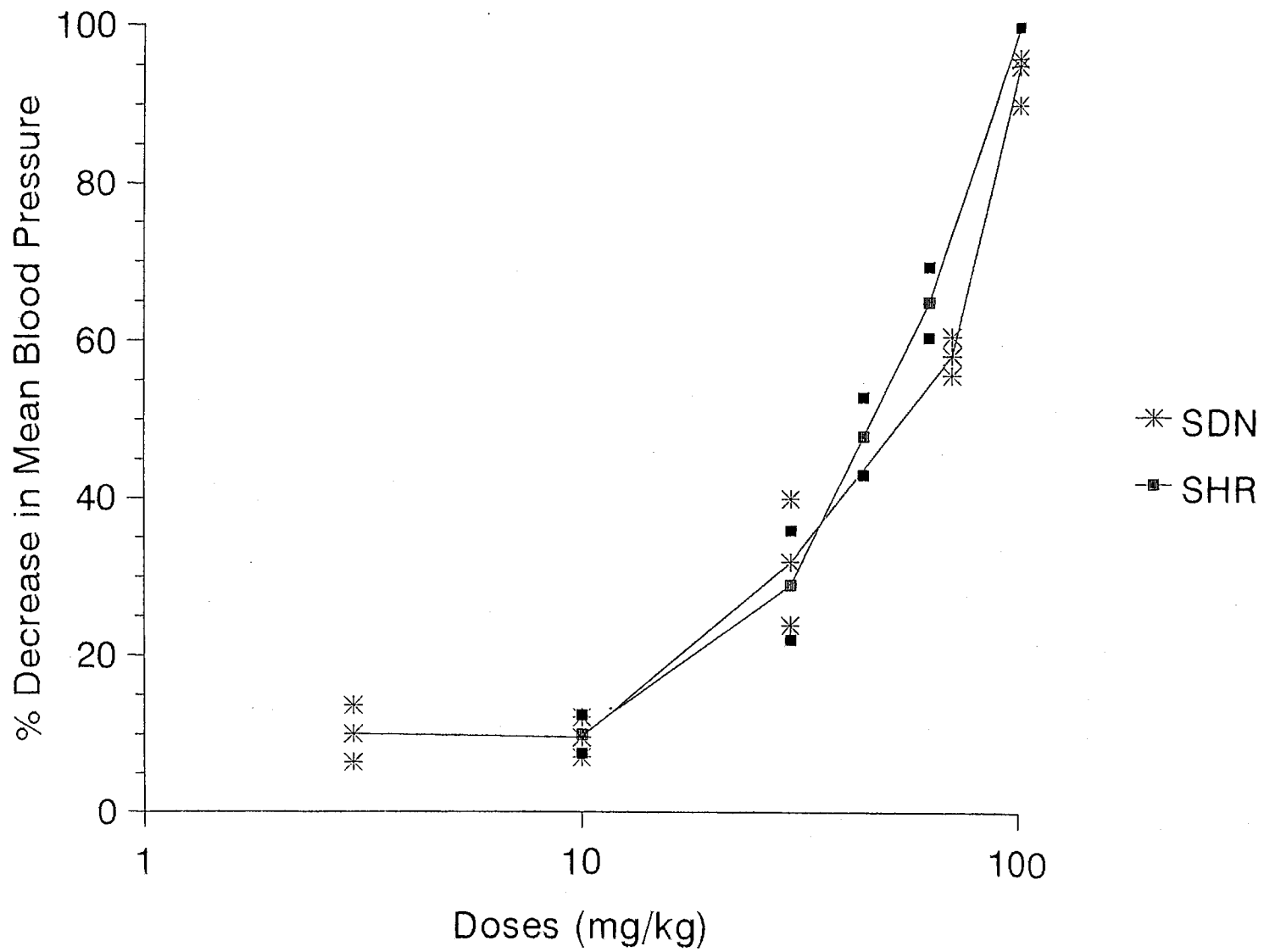
A peripheral effect of the extract is favored by the fact that hypotension persists at important levels between five and sixty minutes after extract administration even though there is a reflex tachycardia.

Future studies must be made with extracts which have been submitted to tannin removing techniques and the possible direct vasodilating effect of the extracts should be tested using isolated organ methods.

References

- ¹ Rogers, Mc. (1963) *Fieldiana: Botany* 24, 382.
- ² Grieve, M. (1971) *A Modern Herbal*, pp. 19-21, Dover Publications, Inc., New York.
- ³ Lionel Germosén-Robineau (ed.) (1995) *Hacia una Farmacopea Caribeña*, pp. 481-483, Enda-Caribe, República Dominicana.
- ⁴ Vargas, S. (1990) *Plantas Medicinales: la naturaleza como guardián de su salud*, p.55, Mundo Gráfico, San José.
- ⁵ Dominguez, X.A., Rojas, P., Garza, M.D.R., Cordoba, J.A. (1962) *Revista Sociedad Química Mex.* 6, 213.
- ⁶ Smith, J.J., Kampine, J.P. (1984) *Circulatory Physiology: the essentials*, p.63, Williams & Wilkins, Baltimore.
- ⁷ Calixto, J.B., Nicolau, M., Rae, G.A. (1986) *Planta Med.*, 52, 32-35.

- Fig. 1. Dose related effects of *P. dioica* total aqueous extract on the mean blood pressure of normotensive rats and final aqueous fraction on the mean blood pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. Each point corresponds to the mean \pm SEM of six rats.
- Fig.2. Percentage change in mean arterial blood pressure of Sprague-Dawley rats with a fixed dose of each fraction of the total aqueous extract, equivalent in weight of fresh leaves to the DE_{50} of the total aqueous extract. The control for the upper fig. was 0.9% saline solution and for the lower fig. was 10% propyleneglycol in 0.9% saline solution.
- Fig.3. Effect of α and β adrenergic, cholinergic and autonomic ganglion blockade on mean blood pressure (mmHg) of SHR during 60 minutes after the DE_{50} of the final aqueous fraction of *P. dioica* was given. The control group only received the DE_{50} of the fraction. Each point represents the mean of six rats. * $p < 0.05$.
- Fig.4. Effect of α and β adrenergic, cholinergic and autonomic ganglion blockade on heart rate (beats/min) of SHR during 60 minutes after the DE_{50} of the final aqueous fraction of *P. dioica* was given. The control group only received the DE_{50} of the fraction. Each point represents the mean of six rats. * $p < 0.05$.



47

Figura 1.

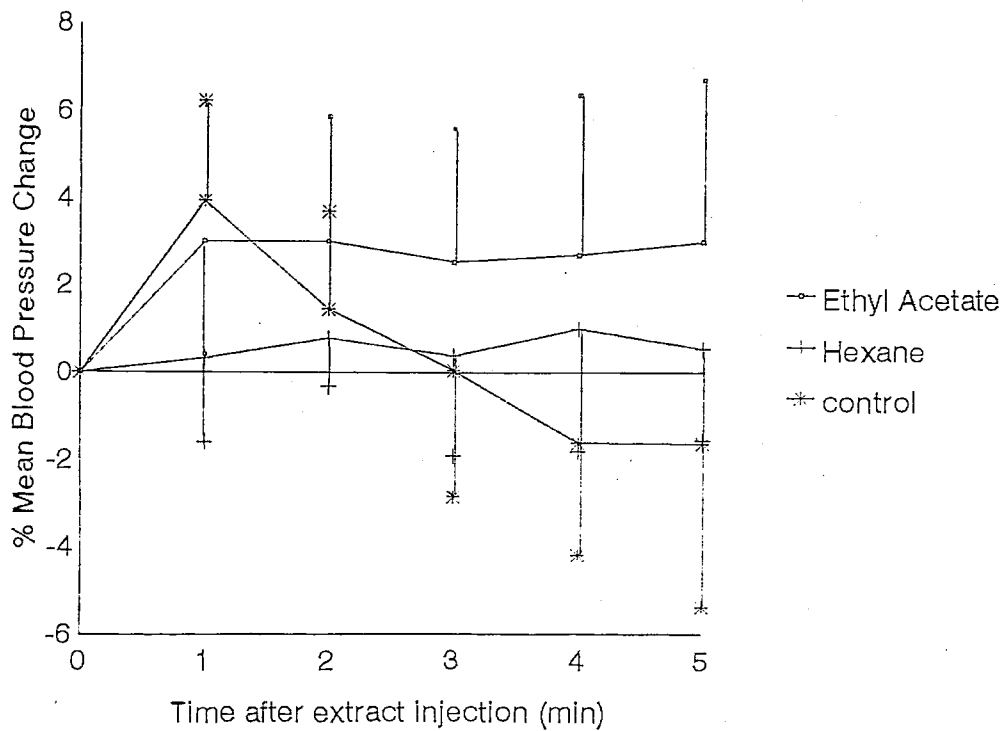
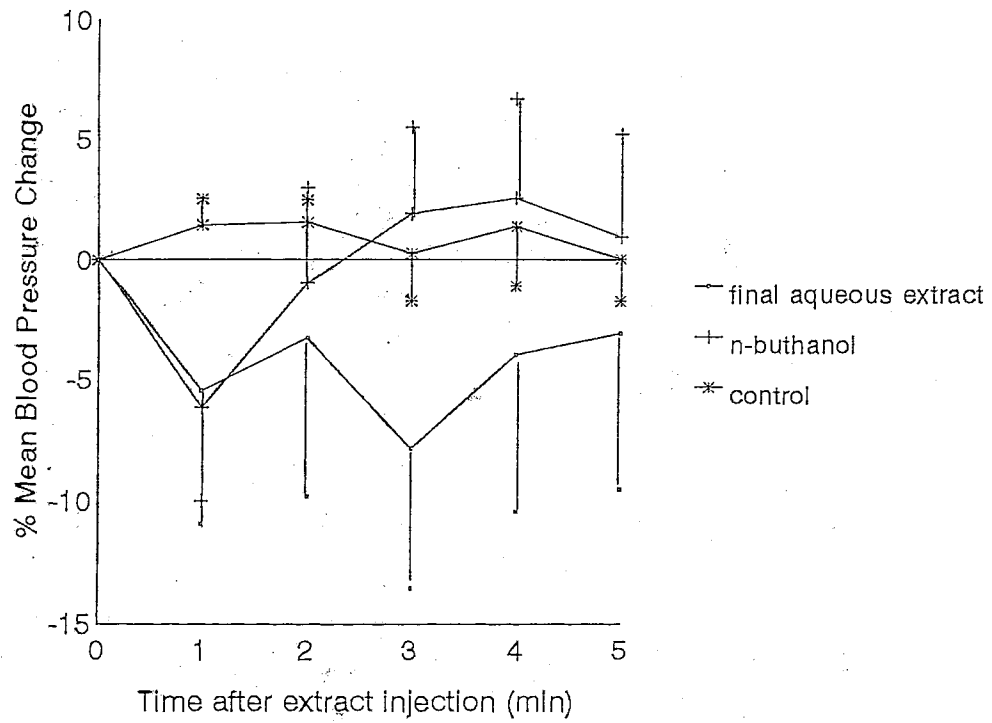


Figura 2

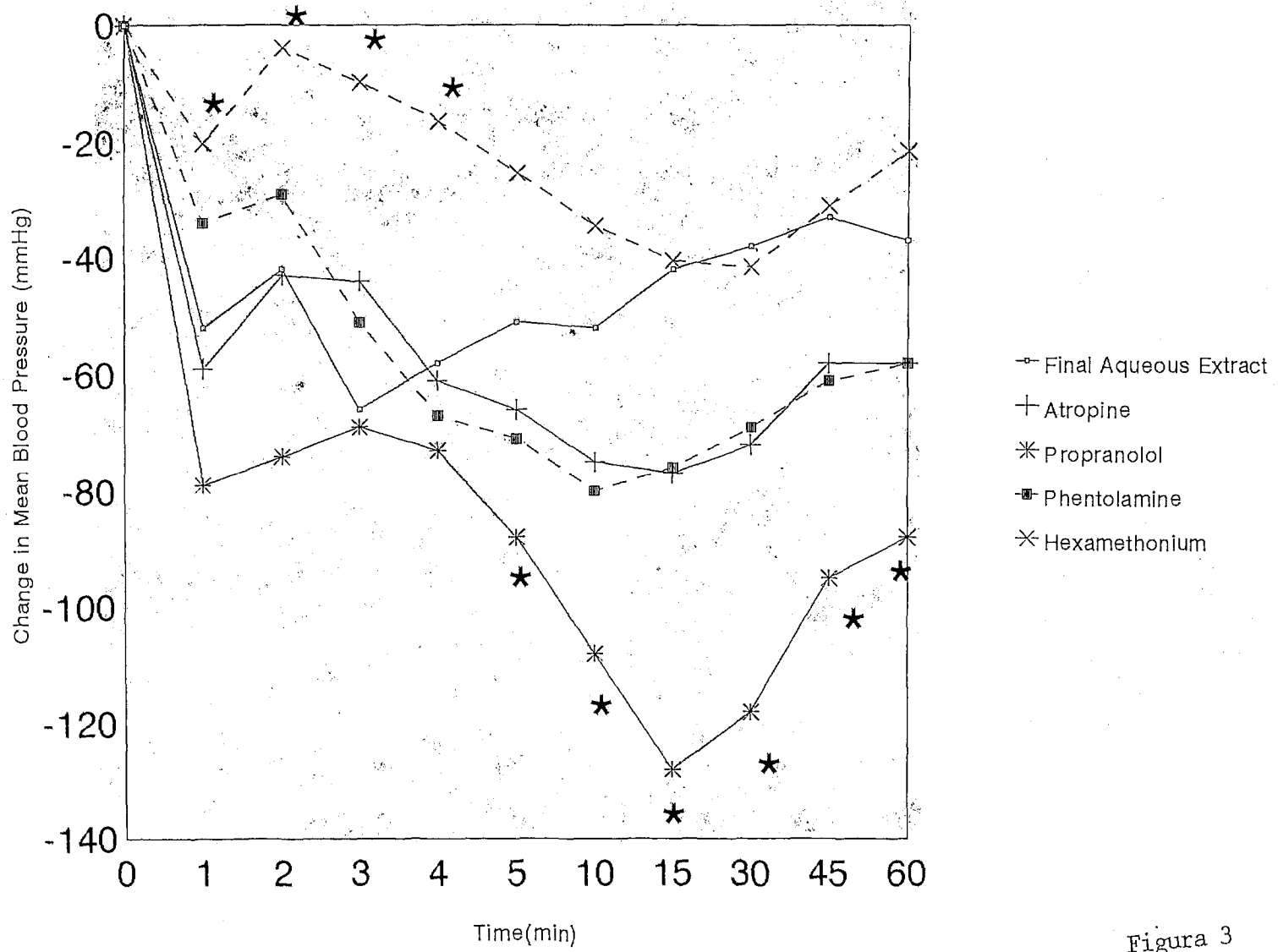


Figura 3

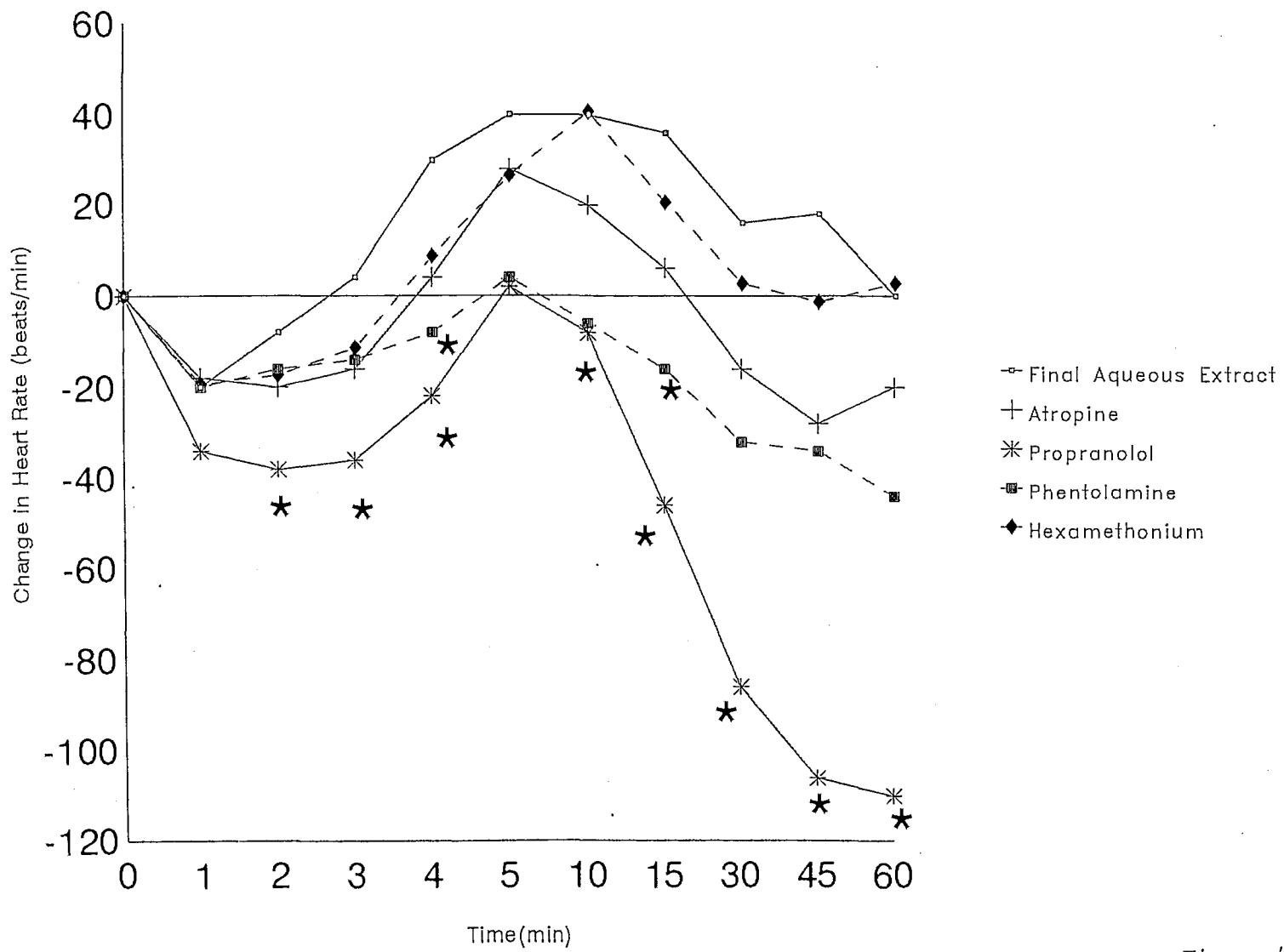


Figura 4

ANEXO A

REVISIÓN DE LA LITERATURA

El uso de las plantas con propósitos medicinales es una práctica tan antigua como el mismo hombre (Wendelberger, 1981; Escohotado, 1994). Las plantas se han utilizado para tratar enfermedades, aliviar el dolor y curar heridas.

Por ejemplo en tablillas sumerias del tercer milenio a.C. ya se hace referencia a la adormidera y en jeroglíficos egipcios se menciona su jugo recomendándolo como analgésico y calmante, tanto en pomadas como por vía rectal y oral (Escohotado, 1994). En tratados chinos de medicina que datan de varios siglos a.C. se hace mención de plantas con efectos alucinantes y muy efectivas para aligerar el cuerpo (Escohotado, 1994). De igual forma, en los libros sagrados hindúes, son numerosas las referencias a plantas medicinales (Escohotado, 1994)y, en un papiro egipcio de 1550 a.C., se describen 700 plantas medicinales y se detallan sus aplicaciones (Wendelberger, 1981).

En Costa Rica, el conocimiento sobre las plantas medicinales proviene de tres grupos humanos: grupo nativo indígena, grupo caucásico y grupo afrocostarricense (Ocampo, 1994; Sarkis, 1985). Sin embargo, La mayor cantidad de información recopilada es sobre la contribución de la población indígena a la medicina tradicional costarricense (Núñez, 1982; García, 1994).

Según Núñez (Nuñez, 1982), Henri Pittier relata los viajes de Bernardo A. Thiel a diferentes regiones del país y menciona algunas plantas medicinales como “el nancite”. También Pittier hace descripciones sobre el papel del “sukia”, o médico de los bribris, y describe como requisito para convertirse en sukia, tener un buen conocimiento de los bosques. Doris Stone (1948) citada por Nuñez (Nuñez, 1982) describe a los indios borucas aliviándose el dolor y mitigando el hambre al masticar una planta de la familia de las piperáceas. A la vez describe cómo los curanderos cabécares utilizaban hierbas,

bejucos y cáscaras de quina para tratar padecimientos. Según Lines. J.A. (1938) citado por Núñez (Núñez, 1982), los "sukias" eran renombrados herbolarios y conocían las virtudes curativas de numerosas plantas.

A pesar de la abundante historia y tradición en el uso de las plantas con fines curativos, especialmente entre grupos indígenas, toda esta información ha sido de difícil recuperación y utilización (Núñez, 1982). Costa Rica es, según el CEPAL, dentro de Centroamérica, el país que tiene la menor demanda de plantas medicinales (Ocampo, 1994). Esto puede obedecer a varios factores como lo son: el alto ingreso económico por habitante, el hecho de que un alto porcentaje del gasto público se dedica a la salud, la amplia cobertura nacional en salud preventiva (Ocampo, 1994) y la cobertura de 90 % a 95 % ofrecida por la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS).

Sin embargo, en los últimos años, y por motivos muy variados, se ha observado un aumento en la utilización de plantas medicinales en países más desarrollados (Fernández, 1982). Lo mismo ha sucedido en Costa Rica y esto se refleja en la aparición de tiendas especializadas en la venta de estos productos y en la abundancia de programas de radio y televisión donde se trata el tema de las plantas medicinales. Este fenómeno puede ser una simple moda pasajera o reflejar un cambio en la visión del hombre y sus vivencias (Fernández, 1982). También se puede deber a otros factores como la recesión económica que vive el país y el encarecimiento de la atención médica y de los medicamentos.

Tanto la medicina alopática como la tradicional sacan provecho de las plantas medicinales. Estas han sido, y serán, una fuente habitual de medicamentos ya sea en forma de preparaciones tradicionales o como origen de principios activos puros. Según Farnsworth (1989) existen por lo menos 119 distintas sustancias químicas de origen vegetal que pueden considerarse fármacos importantes y que actualmente están en uso en algún país (Farnsworth, 1989). El descubrimiento de un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal es el resultado del estudio científico de plantas utilizadas en la medicina tradicional.

Desde 1976 , la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició un esfuerzo por destacar la importancia de la medicina tradicional, estimulando a los países miembros para que identifiquen y estudien los aspectos de esta que puedan ser aplicados en la atención primaria de la salud en los países en desarrollo (Akerele, 1989). Cada país debe hacer un examen cuidadoso, basado en principios científicos, para determinar si las prácticas de la medicina tradicional son eficaces y seguras o más bien tóxicas (Peter, 1988). De esta manera se puede incorporar el conocimiento de la medicina tradicional a un sistema de atención primaria donde cada día el factor económico resulta ser más importante (O.M.S, 1993).

Es urgente, por todos estos motivos, verificar científicamente el efecto atribuido a diferentes plantas medicinales , y además, descartar posibles efectos tóxicos. La creencia popular que dice “ el medicamento que proviene de una planta es natural y por ello inocuo” no es válida (Arena, 1982). Al estudiar, en una forma sistematizada, los efectos de extractos de plantas medicinales sobre el organismo, también será posible fraccionar éstos extractos, y después de verificar su actividad biológica, se podrá aislar, en un momento dado, el principio activo que explique el efecto biológico observado (Akerele, 1988). Una vez que se tenga el principio activo o la fracción que lo contiene, se facilitan los estudios sobre su mecanismo de acción. De esta manera se puede llegar a conocer a fondo la utilidad de las plantas medicinales para luego darles un uso racional.

Dentro de este marco teórico se decidió abordar el tema de las plantas medicinales, enfocado hacia el problema de la hipertensión arterial y el tratamiento que la medicina tradicional o popular recomienda para esta enfermedad. En Costa Rica hay una variedad de plantas utilizadas con éste propósito: *Cecropia obtusifolia* (guarumo) (Salas, 1985), *Syzygium jambos* (manzana rosa) (Romero, 1989), *Casimiroa edulis* (matasano) (Vidrio, 1991; Magos, 1991), *Clusia cocolensis* (copey) (García,1990), *Pimenta dioica* (jamaica) y otras (Vargas, 1990).

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica y constituye un factor de riesgo para diferentes enfermedades (Harrison, 1989) que contribuyen a la mortalidad de la población. Según datos de la oficina de Estadística y Censos, la población costarricense, especialmente la población mayor de 45 años, está muriendo por estas enfermedades (Estadística y Censos, 1995). En 1993, en el grupo etáreo de 45 a 65 años, el 35% de las muertes se debieron a infarto agudo del miocardio y en personas mayores de 65 años, el 42% de las muertes se relacionaron con trastornos cardiovasculares donde la hipertensión arterial juega un papel preponderante (Estadística y Censos, 1995).

En estudios epidemiológicos hechos en el país se calcula que aproximadamente el 16.2 % y el 11.8 % de los hombres y de las mujeres padecen de hipertensión arterial (Campos, 1992). A pesar de que existen muchos medicamentos efectivos para el tratamiento de la hipertensión arterial (Goodman, Gilman, 1991; Harrison, 1989), es importante cualquier intento en descubrir nuevos principios activos útiles en el tratamiento de esta enfermedad.

De hecho, en los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo por estudiar las diversas plantas utilizadas para el tratamiento de la hipertensión arterial en la medicina tradicional de diferentes países americanos (Germosén-Robineau, 1995). En el libro "Hacia una farmacopea caribeña" se citan por lo menos 17 plantas utilizadas en el tratamiento de la hipertensión arterial. Algunas de ellas han sido sometidas a trabajos científicos para comprobar los efectos que se les atribuyen, pero en la mayoría de los casos, falta un adecuado estudio científico.

Se decidió estudiar la *Pimenta dioica* (L.) Merrill (jamaica) ya que ha sido poco estudiada. En Costa Rica se utiliza para el tratamiento de la hipertensión arterial, "azúcar en la sangre", para adelgazar y regular la "digestión lenta" (Vargas, 1990).

En la medicina tradicional de varios países americanos (Caribe) se le atribuye una acción analgésica y se utiliza para el tratamiento de la dismenorrea y el dolor abdominal (Asprey, 1953). En Honduras se utiliza tanto la semilla como las hojas para el dolor de estómago, el dolor de vientre, limpieza del vientre y los vómitos (House, 1994).

La *Pimenta dioica* (L.) Merrill es un árbol que pertenece a la familia Myrtaceae. Es originario del Caribe y Centroamérica (Rogers, 1963). Se le conoce popularmente como “jamaica” y “pimienta gorda” (Germosén-Robineau, 1995; House, 1994). Crece hasta 10-15 metros de altura, tiene la corteza lisa y las hojas son oblongadas o elípticas. Las flores que produce tienen 4 pétalos y son blancas y fragantes. Sus frutos son redondos, aromáticos, de 2 a 10 mm de ancho (Rogers, 1963; House, 1994).

En estudios fitoquímicos se ha determinado que no tiene alcaloides. Sus hojas presentan taninos y aceites esenciales (Dominguez, 1962). El fruto contiene 2-5% de aceite esencial con 35% de eugenol y 40-45% de eugenol-metil-éter, cariofileno y cineol (Germosén-Robineau, 1995).

En la revisión bibliográfica efectuada por medio de NAPRALERT (Farnsworth, 1994) no hay información sobre los efectos cardiovasculares atribuidos a la *Pimenta dioica* (jamaica). Por lo tanto, es importante observar los efectos cardiovasculares de extractos de *Pimenta dioica* en animales, como un primer paso hacia la verificación de los atributos que se le asignan y hacia la posible identificación de principios activos.

Anexo B

Diseño de la investigación

I. Problema

El problema general que se estudia en este trabajo es: ¿Tienen los extractos acuosos y orgánicos de *Pimenta dioica* (jamaica) efectos generales y cardiovasculares en ratas albinas normotensas e hipertensas? De tener efectos cardiovasculares, ¿por medio de qué mecanismos se pueden explicar?

II. Objetivos de la investigación

A. Objetivos Generales

1. Describir los efectos farmacológicos generales de la administración intraperitoneal de los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* y sus fracciones en ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley) (SDN) e hipertensas espontáneas (SHR).
2. Determinar los efectos cardiovasculares de la administración oral e intravenosa de extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* (jamaica) y sus fracciones en ratas normotensas (Sprague-Dawley) y en ratas hipertensas espontáneas (SHR) en preparaciones subagudas y agudas.
3. Establecer el posible mecanismo de acción que permita explicar los efectos cardiovasculares observados con los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* (jamaica) y sus fracciones.

4. Determinar la toxicidad aguda de los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* (jamaica) y sus fracciones en ratas Sprague-Dawley y SHR.

B. Objetivos específicos

1. Efectuar el “ensayo hipocrático” y describir los efectos farmacológicos generales de los diferentes extractos de *Pimenta dioica* (acuoso total, etanólico, en hexano, en acetato de etilo, en *n*-butanol y acuoso final) en ratas normotensas α .

(Sprague-Dawley) y con la fracción de mayor actividad en ratas hipertensas espontáneas (SHR).

2. Observar el efecto de dosis crecientes de los extractos acuoso total y etanólico sobre la presión arterial media, la presión sistólica, la presión diastólica, la frecuencia cardíaca y el electrocardiograma de ratas normotensas (Sprague-Dawley) para hacer una curva dosis respuesta y determinar la dosis efectiva 50 (DE₅₀).

3. Determinar cuál de los dos extractos (acuoso o etanólico) es más potente y fraccionarlo para utilizar cada una de las fracciones en una dosis equivalente a la DE₅₀ del extracto más potente y observar su acción sobre la presión arterial media, presión sistólica, presión diastólica, frecuencia cardíaca y electrocardiograma de ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley).

4. Determinar cuál fracción tiene el mayor efecto sobre la presión arterial media, la presión sistólica, la presión diastólica, la frecuencia cardíaca y el electrocardiograma de ratas albinas normotensas Sprague-Dawley para utilizar esta fracción y hacer una curva dosis efecto en ratas hipertensas espontáneas (SHR). Determinar la DE₅₀.

5. Utilizar la fracción más potente para observar los efectos sobre el peso, la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca de su administración por vía oral durante catorce días en ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley) e hipertensas espontáneas (SHR).
6. Determinar el efecto de la composición iónica de la DE_{50} del extracto acuoso total sobre la presión arterial media, la presión sistólica, la presión diastólica, la frecuencia cardíaca y el electrocardiograma de ratas albinas normotensas Sprague-Dawley.
7. Observar los efectos cardiovasculares de la DE_{50} de la fracción de mayor potencia en presencia de antagonistas de receptores adrenérgicos α y β , receptores ganglionares y receptores muscarínicos en ratas hipertensas espontáneas (SHR) para explicar un posible mecanismo de acción.
8. Determinar la toxicidad aguda de los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* y sus fracciones en ratas Sprague Dawley e hipertensas espontáneas mediante el ensayo hipocrático.

III. Las hipótesis de trabajo son:

1. Los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* y sus fracciones, no tienen efectos farmacológicos generales al ser administrados en ratas normotensas (Sprague-Dawley) e hipertensas espontáneas (SHR) por vía intraperitoneal.
2. El efecto hipotensor de los extractos acuoso total y etanólico, administrados por vía endovenosa a ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley), depende de la dosis del extracto y por esto es posible calcular una dosis efectiva 50 (DE_{50}).

3. El extracto acuoso total y el extracto etanólico, al ser administrados por vía endovenosa a ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley), producen una disminución de la presión arterial media de igual magnitud.
4. Todas las fracciones del extracto más potente (acuoso total o etanólico), al ser administradas por vía endovenosa a ratas albinas normotensas, cada una en una dosis equivalente a la DE_{50} del extracto, producen una disminución de la presión arterial media de igual magnitud.
5. El efecto hipotensor de la fracción más potente, administrada por vía endovenosa a ratas albinas hipertensas espontáneas (SHR), depende de la dosis del extracto y por esto es posible calcular una dosis efectiva 50 (DE_{50}).
6. La administración de la fracción más potente, por vía oral, durante catorce días, a ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley) y a ratas hipertensas espontáneas (SHR), no causa efecto alguno sobre el peso, la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca.
7. La composición iónica de la DE_{50} del extracto acuoso total no afecta la presión arterial media, la presión sistólica, la presión diastólica, la frecuencia cardíaca, ni el electrocardiograma de ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley), al administrarse una solución por vía endovenosa.
8. El efecto hipotensor de la administración endovenosa de la DE_{50} de la fracción más potente es reducido por el bloqueo α , el bloqueo β , el bloqueo ganglionar y el bloqueo muscarínico.

9. Los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* y sus fracciones, no presentan efectos tóxicos al ser administrados por vía intraperitoneal a ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley) e hipertensas espontáneas (SHR).

IV. Definición de Variables

A. Variables Dependientes:

1. **Presión arterial media (PAM):** Es la presión promedio durante un ciclo cardíaco que existe en la aorta y en sus ramas mayores (Berne, 1993). Para calcularla se utilizaron los valores medidos de las presiones sistólica (PS) y diastólica (PD) mediante la siguiente fórmula: $PAM = PD + 1/3 (PS-PD)$. Se mide en mmHg.

2. **Presión arterial sistólica (PS) :** Es la presión máxima obtenida en las grandes arterias, asociada con la sístole del ciclo cardíaco (Berne, 1993). Para su determinación se utilizaron dos métodos : 1. Método directo mediante la cateterización de la arteria carótida izquierda con un catéter PE 50 con solución salina al 0,9% heparinizada. El catéter se conecta a un transductor de presión Viggo-Spectramed, modelo P 23 XL, el cual, a su vez, está conectado a un preamplificador Grass, modelo 7P1K, y a un amplificador Grass, modelo 7DAL, de un polígrafo fisiológico, donde se hace el registro de la presión. 2. Método indirecto mediante un manguito inflable y un micrófono colocados en la cola de los animales, ambos conectados a un polígrafo marca Narco Bio System Inc. Se mide en mmHg.

3. **Presión arterial diastólica (PD) :** Es la presión mínima en las grandes arterias, asociada con la diástole del ciclo cardíaco (Berne, 1993). Para su determinación se utiliza el método directo explicado para la presión arterial sistólica. Se mide en mmHg.

4. **Frecuencia cardíaca:** Número de latidos cardíacos por minuto (Berne, 1993). Se determina contando en el registro del electrocardiograma el número de ondas R en cinco segundos y luego haciendo un cálculo para dar la frecuencia cardíaca en lat/min. También se calculó cuando se hizo el registro por el método indirecto de la presión sistólica, en este caso se contaron las ondas de pulso.

5. **Peso corporal:** Los animales son pesados utilizando una balanza con canasta especial para ratas. Se mide en gramos.

6. **Efectos tóxicos:** Se refiere a cualquier efecto adverso producido por la administración de una sustancia química sobre organismos vivos (Goodman y Gilman, 1991). En este caso lo que se valora es si el extracto de la planta produce la muerte del animal experimental y a qué dosis lo hace. También se valora mediante una autopsia si la administración del extracto afecta en forma macroscópica los principales órganos del animal. La valoración de la toxicidad se hace desde que se administra el extracto hasta 2 días después.

7. **Efectos farmacológicos generales:** son los efectos observados en diferentes sistemas corporales, al administrar un medicamento. En este caso se refiere a los efectos observados al administrar los diferentes extractos y fracciones de *Pimenta dioica* a ratas albinas normotensas e hipertensas, sobre diferentes parámetros que se han agrupado en varias categorías para facilitar su obtención y registro (Sandberg, 1967), a saber: efectos sobre sistema nervioso central (SNC), efectos generales, efectos subjetivos y efectos sobre parámetros obtenidos de la observación de los ojos y orejas. Del registro de estos parámetros se obtiene información sobre el efecto de los extractos en diferentes sistemas corporales como el sistema nervioso autónomo, el sistema nervioso somático, el sistema cardiovascular, el sistema respiratorio, el sistema gastrointestinal, y el renal.

Para el registro del efecto de los extractos sobre los diferentes parámetros se utiliza una hoja especial (ver anexo E) . Las observaciones se realizan a los 5, 15, 30, y 60 minutos, y a las 2, 4, 6, 24 y 48 horas, después de la administración del extracto. La intensidad del efecto en los sistemas se cuantifica por medio de cruces de 0 a +++++. Es importante señalar que la ausencia de un signo es tan importante como su presencia por lo que la casilla correspondiente nunca debe de aparecer en blanco.

Los parámetros que se evalúan son los siguientes:

I. Aquellos que indican disminución de actividad del sistema nervioso central:

- Disminución de la actividad motora: (+), el animal está quieto, ocasionalmente se mueve en forma espontánea; +, no se mueve espontáneamente pero al manipularlo se moverá lentamente; ++, cuando es manipulado se moverá tardíamente; +++, cuando es manipulado no se moverá para nada.
- Ataxia: (+), cuando se mueve muestra ocasionalmente incoordinación detectable; +, cuando se mueve se observa incoordinación pero el progreso de la marcha es errática; ++, la rata no puede caminar erecta, el progreso de la marcha es errática; +++, no puede caminar en ninguna dirección.
- Pérdida del reflejo de enderezamiento: (+), la parte posterior del cuerpo incluyendo las patas traseras pueden ser colocadas de un lado; +, la rata puede ser colocada solo de un lado; ++, la rata puede ser colocada de ambos lados; +++, la rata puede ser colocada sobre la espalda así como sobre cualquier lado; +++++, la rata no puede ser enderezada de la posición sobre la espalda por medio de un pinchazo en el dedo de la pata posterior.

- Analgesia: (+), cuando la uña del investigador es presionada firmemente sobre uno de los dedos de las patas traseras de la rata y se presenta una respuesta tardía con vocalización y/o intento de escapar o morder; +, cuando se presiona con la uña y no hay vocalización ni intentos de escapar y morder pero la rata intenta calmadamente de retirar la pata de la presión; ++, no hay respuesta.
- Anestesia: +, la rata es colocada sobre uno de sus costados y permanece así y no puede ser movida de esta posición por manipulación.
- Reflejo corneal y pineal: (+), respuesta retardada cuando el extremo del pelo de caballo toca la córnea y el canal auditivo; +, no hay respuesta del todo.
- Parálisis de las patas anteriores, posteriores, cabeza: Se revisa manipulando las partes respectivas y se clasifica: (+), la cabeza o las patas caen tardíamente hacia atrás después de levantarlas y soltarlas; +, la cabeza o piernas caen rápidamente hacia atrás después de levantarlas y soltarlas; la rata no puede hacer ningún movimiento muscular.
- Pérdida de la actividad prensil: con esta prueba se revisa la fuerza muscular y la coordinación. La rata es puesta en el centro de la malla horizontal y ésta es entonces invertida y agitada delicadamente hacia atrás y adelante en un plano horizontal. Se clasifica como sigue: +++++, la rata cae al ladear la malla en un ángulo de 45° ; +++, la rata cae de la malla cuando está en un ángulo de 90° ; ++, la rata cae cuando la malla ha sido invertida; +, la rata cae con la primera sacudida de la malla. Se anota además si falló primero la actividad prensil en las patas delanteras o traseras.
- Reacción de alarma: se revisa golpeando fuertemente la parte externa del corral de observación (ver materiales y métodos). Se clasifica: +++++, la rata no se altera para nada, como si no hubiera escuchado el estímulo; +++, la rata da un impulso muy

leve; ++, la rata da un impulso moderado; +, la rata se sacude visiblemente; 0, la rata se sacude, salta e intenta escapar.

II. Aquellos que indican aumento de actividad del sistema nervioso central:

- Reacción de alarma: se revisa golpeando fuertemente la parte externa del corral de observación (ver materiales y métodos). Se clasifica como sigue: (+), la rata da un impulso moderado; +, la rata se sacude visiblemente; ++, la rata se sacude, salta y realiza un intento repentino de franco escape; +++, la rata cae instantáneamente con convulsiones clónicas.
- Temblores finos del cuerpo: no se perciben a simple vista. Se observan mejor al colocar ligeramente los dedos en la espalda de la rata sobre la espina dorsal. Se clasifica: (+), la presencia equívoca; +, presencia definitiva pero solamente se notan movimientos esporádicos; ++, temblores continuos; +++, los temblores ocasionalmente son detectables por observación sin tener que recurrir a tocar la espalda.
- Temblores fuertes del cuerpo: (+), presencia equívoca; +, presencia definitiva pero solamente en forma esporádica; ++, temblores continuos; +++, temblores pronunciados cercanos a convulsiones.
- Fasciculaciones: son movimientos de la piel en forma de ondas hacia la parte posterior y se clasifican: (+), respuesta equívoca; +, fasciculaciones definitivas en un área, pero el movimiento no es continuo; ++, fasciculaciones en más de un área pero el movimiento no es continuo; +++, se observa fasciculación en muchas áreas simultáneamente con respuesta persistente al menos sobre un área de forma continua; +++++, fasciculaciones continuas que involucran todas las áreas.

- Convulsiones clónicas: estas se clasifican dependiendo de la severidad y duración del ataque; +, convulsiones esporádicas; ++, convulsiones casi continuas; +++, las convulsiones son muy severas y la rata muere.
- Convulsiones tónicas: son clasificadas en forma similar a las anteriores: +, la rata estira las patas traseras y el cuerpo está rígido y reacciona cuando es tocada; ++, convulsiones repetidas, entre una convulsión y otra la rata yace sobre su costado; +++, las convulsiones son muy severas y la rata muere.
- Convulsiones de tipo mixto: Con ambos tipos de convulsiones: tónicas y clónicas, estas son clasificadas de forma similar a las anteriores.

III. Parámetros que se derivan de la observación de los ojos:

- Enofthalmía y exoftalmía: son clasificados subjetivamente en base a una escala de (+) a ++ después de la evaluación con una mirada a la rata no tratada que está en el corral de observación: (+), respuesta equívoca; +, respuesta definitiva; ++, respuesta pronunciada. Los agentes hipotensores producen enofthalmía mientras que los hipertensores producen exoftalmía.
- Ptosis palpebral: Es determinada después de alertar manualmente a la rata para asegurar que la ptosis es una situación permanente. La respuesta ptósica es clasificada: 0, apertura normal de los párpados; +, cierre notable de los párpados; ++, cierre a la mitad; +++, cierre casi completo; +++, cierre completo. Se debe de verificar que el cierre de los párpados no se debe a secreciones en el ojo.
- Tamaño de la pupila: Se mide bajo una fuente de iluminación constante pero difusa. Se debe de tener cuidado de no excitar al animal. Después de una lectura normal, la pupila es medida de acuerdo con su respuesta a la luz. Normalmente la

rata muestra una contracción de la pupila que es marcada 0, la falta de contracción es marcada + en la hoja de trabajo.

- Nistagmus: Es clasificado mirando ambos ojos simultáneamente de frente a la rata. Se anota su presencia +.
- Lacrimación, cromodaciorrea: Se miden doblando a la mitad un papel filtro (Whatman No.1) y colocando delicada pero firmemente la esquina doblada de éste dentro del lado interno del ojo de la rata. El papel filtro drena los fluidos del saco conjuntival en 20 segundos y provee un documento permanente de la respuesta dual de lacrimación y cromodaciorrea. Luego el papel es desdoblado y la extensión de la mancha causada por las lágrimas o la sangre se mide en milímetros.

IV. Parámetros que se derivan de la observación de las orejas:

- Palidez e hiperemia: Se clasifican subjetivamente en base al número de vasos sanguíneos aparentes y el color general de la oreja: (+), efecto equívoco; +, respuesta definitiva; ++, respuesta pronunciada.
- Cianosis: Se clasifica subjetivamente por visualización del color de las orejas, patas y mucosa oral. La cianosis corresponde a un color violáceo. Se clasifica: (+) a ++. El grado de cianosis se determina comparando con la rata control.

V. Parámetros Generales:

- Salivación: Se clasifica usando la siguiente escala numérica: ++ = máxima respuesta con la saliva goteando activamente de las mandíbulas; + = las mandíbulas y la piel de la barbilla están húmedas no se observa goteo; (+) = las mandíbulas y la piel de

la barbilla no están húmedas pero el humedecimiento del papel filtro es notado cuando el papel es frotado bajo la mandíbula; 0 = ausencia de respuesta, respuesta normal igual al control, cuando el papel filtro que es frotado bajo la mandíbula permanece seco.

- Erección de la cola: (+), la cola está recta $10-40^{\circ}$ o sólo intermitentemente a este nivel; +, la cola está erecta $40-60^{\circ}$; ++, la cola está erecta $60-90^{\circ}$; +++, la cola está erecta más de 90° ; +++++, una cola tensa que se arquea cercana sobre la espalda.
- Erección pilomotor: +, erección pilomotor definitiva en la región del cuello; ++, todo el pelo de la rata está erecto y con apariencia áspera.
- Micción: Es notada por las manchas de orina sobre el papel y si la rata está húmeda en la parte superior de las patas posteriores.
- Diarrea: Se observa notando el grado de manchas de heces sobre el papel del corral de observación cuando la temperatura rectal es medida. Es calificada como sigue: 0, el termómetro está limpio cuando se saca o si sólo heces firmes siguen al termómetro; (+), cuando las heces son retiradas del papel dejan una mancha pequeña pero detectable; +, heces semifirmes que dejan una mancha del tamaño de las heces; ++, heces suaves y las manchas superan los límites de las heces; +++, una masa de heces sin forma que mancha pronunciadamente el papel.
- Priapismo o colpectasia: Para la rata hembra se anota la presencia (+) o la ausencia 0 de descarga del canal vaginal, además si la descarga es clara o lechosa y si la mucosa alrededor de la vagina está inflamada y rojiza. En el macho, el priapismo (erección del pene) es clasificada (+) equívoca; +, presente.
- Signo de Robichaud: La piel de la espalda de la rata se sostiene entre el dedo pulgar y el índice hasta que el animal ha sido alzado sobre sus patas y entonces súbitamente

se libera el pliegue de la piel. En un animal normal la piel se reajusta al contorno del cuerpo rápidamente. Si el pliegue persiste por 3-5 segundos después de liberado, la respuesta se clasifica como+; si persiste por más de 5 segundos ++.

- Movimientos circulares: Se clasifican como ausentes (0) o presentes +. Se manifiestan al levantar la rata por la cola y esta comienza a girar alrededor.
- Temperatura rectal: Se mide la temperatura de la rata insertando un termómetro por vía rectal.

VI. Parámetros subjetivos:

Prueba de los golpes en la cabeza: Con el extremo de un palo de madera se le dan tres golpes estimulantes, sucesivos y verticales sobre el cráneo de la rata entre los ojos par así revisar la reacción del animal a esta prueba. Las ratas tienen un patrón normal de reacción que cae dentro de tres tipos discernibles: agresión (mordiéndolo el palo o atacando el extremo del palo), pasividad (ignorando el palo) y temor (volviéndose y escapándose).

V. Definición de términos

1. Dosis Efectiva 50 (DE₅₀) : Es la dosis del extracto que al ser administrada intravenosamente produce una disminución de la presión arterial media que corresponde a un 50% de la disminución máxima observada en la curva dosis-respuesta. Se calculó de dos formas diferentes. En un caso se calculó mediante una fórmula de ajuste de linealidad para la curva dosis respuesta (curva dosis respuesta del extracto acuoso total en ratas Sprague-Dawley) y en otro caso se calculó en forma gráfica a partir de la curva dosis-respuesta (curva dosis respuesta de la fracción acuosa final del extracto acuoso en ratas SHR).

2. Extracto más potente ó fracción más potente: La potencia de una droga depende de la localización de la curva dosis-efecto a lo largo del eje de la dosis (Goodman y Gilman, 1987). Para decidir cuál extracto es más potente, el acuoso total o el etanólico, se administra la misma dosis de los dos extractos y se escoge el que produce el mayor efecto hipotensor. Para decidir cuál de las fracciones del extracto es más potente, se administran en una dosis equivalente a la DE₅₀ del extracto y se comparan los efectos hipotensores.

3. Bloqueo α adrenérgico: Se lleva acabo administrando un bloqueador α adrenérgico como la fentolamina (2 mg/kg) antes de la administración intravenosa del extracto. Se verifica el bloqueo al dar un agonista α adrenérgico como la metoxamina (50 ug/kg) y verificando que el cambio en la presión arterial media no sea mayor del 10%.

4. Bloqueo β adrenérgico: Se lleva acabo administrando un bloqueador β adrenérgico como el propranolol (0.4 mg/kg) antes de la administración intravenosa del extracto. Se verifica el bloqueo al dar un agonista β adrenérgico como el isoproterenol (0.5 ug/kg) y verificando que el cambio en la presión arterial media no sea mayor del 10%.

5. **Bloqueo muscarínico:** Se lleva acabo administrando un bloqueador muscarínico como la atropina(1 mg/kg) antes de la administración intravenosa del extracto. Se verifica el bloqueo al dar un agonista muscarínico como la acetilcolina (1ug/kg) y verificando que el cambio en la presión arterial media no sea mayor del 10%.

6. **Bloqueo ganglionar:** Se lleva acabo administrando un bloqueador ganglionar como el hexametonio (20 mg/kg) antes de la administración intravenosa del extracto

Anexo C

Ampliación de la Metodología

Esta investigación se llevó a cabo administrando los extractos acuoso y etanólico de *Pimenta dioica* y sus fracciones a ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley) e hipertensas espontáneas (SHR) ya sea por vía intraperitoneal, endovenosa u oral.

En este anexo sólo se incluye información metodológica que por motivos de espacio no se encuentra en el cuerpo del trabajo.

1. Sujetos experimentales:

Todos los animales utilizados en la investigación se obtuvieron de la Unidad de Bioterios de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizaron ratas albinas normotensas Sprague-Dawley y ratas hipertensas espontáneas (SHR).

Las ratas SHR (Spontaneously hypertensive rats) son un modelo genético de hipertensión arterial. Fueron desarrolladas por Okamoto y Aoki en Japón al cruzar en forma endogámica una colonia de ratas Wistar-Kyoto (Lovenberg, 1986). Constituyen uno de los mejores modelos experimentales para el estudio de la hipertensión arterial esencial, ya que éstas ratas presentan muchas semejanzas con el paciente hipertenso esencial. No obstante, es importante destacar que también hay importantes diferencias entre ellos (Frohlich, 1986). En ratas no hay un modelo de hipertensión arterial único que abarque todos los factores posiblemente involucrados en la generación de la

hipertensión esencial por lo que, al utilizar un modelo en particular, sabemos de antemano que se están pasando por alto factores que podrían ser importantes en la etiología de la enfermedad y en su tratamiento.

Conociendo estas limitaciones se utilizaron las ratas hipertensas espontáneas (SHR) para observar los efectos de extractos de *Pimenta dioica*, ya que en esta fase de la investigación no es conveniente hacer pruebas directamente en humanos y las ratas SHR son un modelo animal bastante adecuado de hipertensión arterial (Frohlich, 1986).

2. Preparación de los extractos vegetales

La preparación de los extractos ha sido descrita detalladamente en el cuerpo de la tesis, sólo se debe agregar que los extractos se prepararon con hojas de un árbol de *Pimenta dioica* identificado por el Profesor L.J. Poveda de la Universidad Nacional. Posteriormente se hizo la clasificación de la especie en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (Jorge Gómez-Laurito).

3. Ensayo hipocrático

Se realizó para estudiar los efectos farmacológicos generales de los extractos acuoso y etanólico de *P. dioica* y sus fracciones.

Se llevó a cabo en ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley) y con la fracción de mayor actividad biológica en ratas hipertensas espontáneas (SHR).

Se utilizó el procedimiento de Malone y Robichaud (1962) modificado por Sandberg (1967): Para realizar el ensayo hipocrático se utiliza un encierro de madera de 58cm x 58 cm x 14 cm en el cual se colocan las ratas para observarlas. El marco de madera se

coloca sobre papel periódico blanco lo que facilita observar si la rata defeca o micciona.

Se utilizan además, un termómetro rectal, una malla de alambre de 30 cm x 36 cm con 13 hebras por cada 10 cm², para medir la actividad prensil de la rata, cronómetro y un pelo de caballo sujetado a un trozo de madera que se utiliza para examinar los reflejos corneal y pineal de la rata y el extremo de madera para observar la respuesta al golpe de la cabeza de la rata.

4. Estadística

Para realizar el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) del SAS Institute Inc. en Carolina del Norte, Estados Unidos de América. Se utilizó la versión No.6 de este paquete estadístico y específicamente la versión para microcomputadoras personales.

Anexo D

Análisis adicional de los resultados

En este anexo se incluyen datos adicionales que por motivo de espacio no se trataron en el cuerpo de la tesis. Se presentan además cuadros con promedios, desviaciones estándar, errores estándar y las matrices de los análisis de variancia y de los GLM (Modelo lineal general). También se incluyen algunas figuras adicionales que pueden ayudar en la comprensión de los datos.

Cuadro 1. Efecto máximo en el ensayo hipocrático de la fracción acuosa final del extracto acuoso de

Pimenta dioica administrada por vía intraperitoneal a ratas concientes hipertensas espontáneas (SRH)

Dosis mg/ kg	Disminución Actividad Motora	Pérdida Reflejo Enderezamiento	Analgesia	Pérdida Reflejo Corneal Pineal	Pérdida Actividad Prensil	Pérdida reacción alarma	Tamaño pupila (mm)	Palidez	Disminución Temperatura rectal °C	Otros signos
500	+3	+2	+2	0	0	+1	2.5	0	5	Mortalidad 100% 2-24 hr
250	+2	0	0	0	0	+1	2.5	0	4.3	Mortalidad 100% 6-24hr
125	+1	0	0	0	0	0	2.5	0	2.6	

Cuadro 2. Variación de la presión arterial sistólica (mm Hg) en ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*.

Ani- mal	Tiempo	0			7			10			14		
	(días)	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA
Nº													
1	172	177	195	190	155	172	197	150	215	229	243	236	
2	195	177	190	171	155	170	231	191	207	207	212	208	
3	175	170	202	200	190	187	197	195	242	256	242	253	
4	220	203	191	247	207	219	222	232	237	227	229	266	
X	191	182	195	202	177	187	212	192	225	230	232	241	
E.E	11	7	3	16	13	11	9	17	9	10	7	13	

Notas: a. X = promedio, E.E. = error estándar

b. C = control. Recibió agua destilada

DB= dosis baja 140 mg/kg

DA = dosis alta 280 mg/kg

Cuadro 3. Variación de la presión arterial sistólica (mm Hg) en ratas Sprague-Dawley tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica*

Animal Nº	Tiempo (días)	0			7			10			14		
		C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA
1		146	125	115	135	126	122	118	115	150	150	162	133
2		123	123	112	127	132	135	154	141	131	144	175	189
3		114	113	133	134	131	186	130	134	175	169	153	175
4		123	118	134	150	145	146	168	155	147	152	158	188
X		127	119	124	137	134	147	143	136	151	154	162	171
E.E		7	3	6	5	4	14	11	8	9	5	5	13

Notas: a. X = promedio, E.E. = error estándar
b. C = control. Recibió agua destilada
DB= dosis baja 140 mg/kg
DA = dosis alta 280 mg/kg

Cuadro 4. Variación de la frecuencia cardíaca (lat/min) en ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica*

Animal Nº	Tiempo (días)	0			7			10			14		
		C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA
1		408	448	444	474	404	408	468	444	432	420	412	420
2		420	444	444	438	444	426	408	456	396	360	384	354
3		450	390	402	408	444	396	384	402	432	384	372	420
4		438	444	420	435	468	444	460	480	426	420	462	468
X		429	432	428	439	440	419	430	446	422	396	408	416
E:E		9	14	10	14	13	11	20	16	9	15	20	23

- Notas:
- X = promedio, E.E. = error estándar
 - C = control. Recibió agua destilada
DB= dosis baja 140 mg/kg
DA = dosis alta 280 mg/kg

Cuadro 5. Variación de la frecuencia cardíaca (lat/min) en ratas Sprague-Dawley, tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica*

Animal	Tiempo	0			7			10			14		
	(días)	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA
Nº													
1	486	398	412	432	376	420	432	384	396	468	432	408	
2	438	426	366	426	390	396	342	360	402	462	420	360	
3	420	432	432	432	444	372	372	328	408	456	336	432	
4	438	432	438	402	390	402	408	414	384	408	436	408	
X	446	422	412	423	400	398	389	371	398	449	406	402	
E.E	14	8	16	7	15	10	20	18	5	14	24	15	

Notas: a. X = promedio, E.E. = error estándar
b. C = control. Recibió agua destilada
DB= dosis baja 140 mg/kg
DA = dosis alta 280 mg/kg

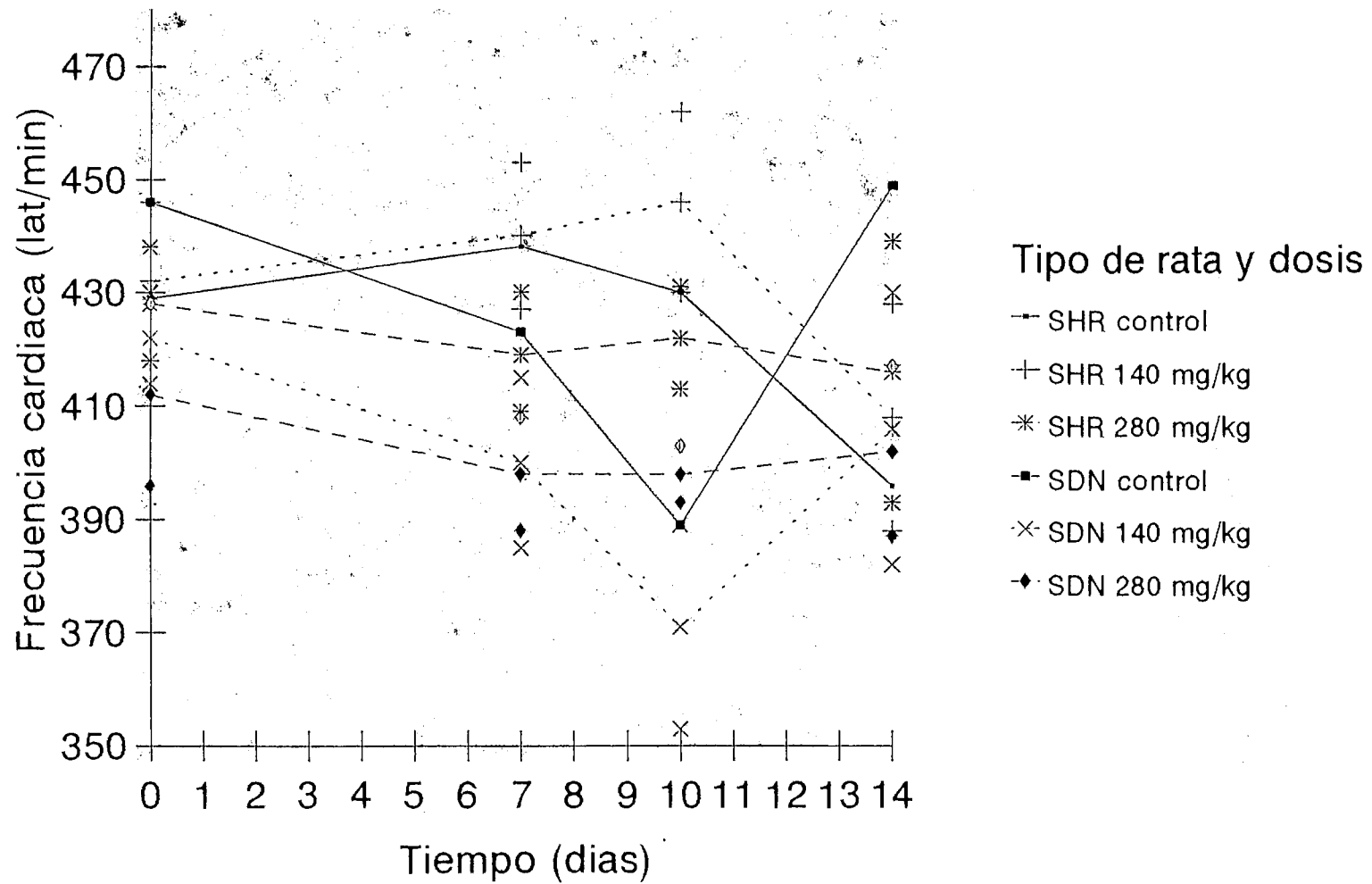


Fig.1 Variación de la frecuencia cardíaca en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*. Se indica el E.E. para los grupos tratados

Cuadro 6. Variaciones en el peso (g) en ratas hipertensas espontáneas (SHR), tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica*

Animal	Tiempo (días)	0			7			10			14		
		C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA
Nº													
1		210	219	222	206	222	221	210	219	223	220	230	238
2		219	221	214	221	223	214	223	227	216	228	230	224
3		219	209	235	225	209	233	228	209	243	231	215	246
4		210	238	246	206	246	250	210	250	253	220	257	259
X		215	222	229	215	225	230	218	226	234	225	233	242
E.E		3	6	7	5	8	8	5	9	9	3	9	7

- Notas:
- X = promedio, E.E. = error estándar
 - C = control. Recibió agua destilada
DB= dosis baja 140 mg/kg
DA = dosis alta 280 mg/kg

Cuadro 7. Variaciones en el peso (g) en ratas Sprague-Dawley, tratadas por vía oral durante 14 días con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica*

Animal N°	Tiempo	0			7			10			14		
	(días)	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA	C	DB	DA
1	206	224	240	217	210	254	225	208	264	238	214	279	
2	252	234	238	251	217	225	266	231	227	285	252	253	
3	253	236	217	272	227	261	278	243	279	289	257	300	
4	241	226	226	276	237	278	284	240	283	303	260	301	
X	238	230	230	254	223	255	263	231	263	279	246	283	
E.E	11	3	5	14	6	11	13	8	13	14	11	11	

- Notas:
- a. X = promedio, E.E. = error estándar
 - b. C = control. Recibió agua destilada
DB= dosis baja 140 mg/kg
DA = dosis alta 280 mg/kg

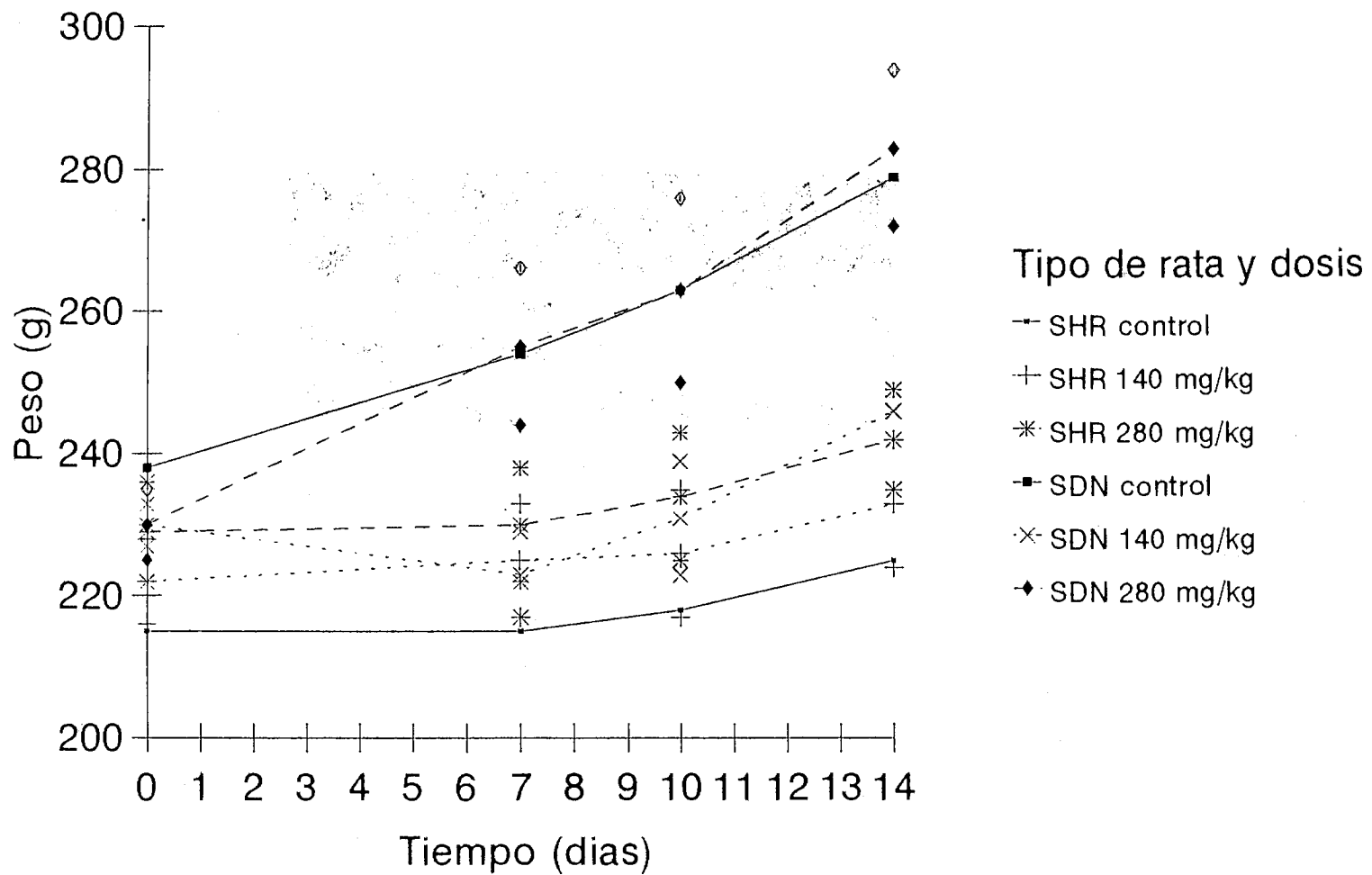


Fig.2 Variación del peso en ratas SHR y SDN durante el tratamiento con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*. Se indica el E.E. para los grupos tratados.

Cuadro 8. Matriz del GLM (Modelo lineal general) comparando la PAS de ratas hipertensas espontáneas (SHR) y Sprague Dawley tratadas con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *P. dioica* durante 14 días, por vía oral

Tiempo				
Días	Dosis	1	2	3
7	1	•	0.3019	0.8530
	2	0.3019	•	0.2267
	3	0.8530	0.2267	•
10	1	•	0.0347	0.3142
	2	0.0347	•	0.2315
	3	0.3142	0.2315	•
14	1	•	0.3158	0.1287
	2	0.3158	•	0.5843
	3	0.1287	0.5843	•

Nota: 1= dosis de 280 mg/kg/día

2= dosis de 140 mg/kg/día

3= control agua destilada

PAS= Presión arterial sistólica

Cuadro 9. Matriz del GLM (Modelo lineal general) comparando la frecuencia cardíaca de ratas hipertensas espontáneas (SHR) y Sprague Dawley (SDN) tratadas con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *P. dioica* durante 14 días, por vía oral.

Tiempo				
Días	Dosis	1	2	3
7	1	•	0.3138	0.0629
	2	0.3138	•	0.3603
	3	0.0629	0.3603	•
10	1	•	0.9509	0.9877
	2	0.9509	•	0.9632
	3	0.9877	0.9632	•
14	1	•	0.9195	0.4979
	2	0.9195	•	0.4372
	3	0.4979	0.4372	•

Nota: 1= dosis de 280 mg/kg/día
 2= dosis de 140 mg/kg/día
 3= control agua destilada

Cuadro 10. Matriz del GLM comparando el peso de ratas SHR y SDN tratadas con dos dosis diferentes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *P. dioica* durante 14 días por vía oral.

Tiempo				
Días	Dosis	1	2	3
7	1	•	0.0780	0.4364
	2	0.0780	•	0.3003
	3	0.4364	0.3003	•
10	1	•	0.0666	0.4496
	2	0.0666	•	0.2562
	3	0.4496	0.2562	•
14	1	•	0.0388	0.3161
	2	0.0388	•	0.2505
	3	0.3161	0.2505	•

Nota: 1= dosis de 280 mg/kg/día

2= dosis de 140 mg/kg/día

3= control agua destilada

Cuadro 11. Valores de la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas, tratadas con dosis crecientes del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* administrado por vía endovenosa.

Dosis					
mg/kg	3	10	30	70	100
Valores de PAM inicial X ± DE	131± 14	147± 10	143±12	139± 20	146± 13
PAM mínima después de extracto	118± 18	132±10	97± 27	58±10	8±18
Disminución porcentual de la PAM	10±9	10±6	32±20	58±6	95±12

Nota: a. X= promedio, D.E = desviación estándar

b. Cada dosis corresponde al promedio de 6 ratas

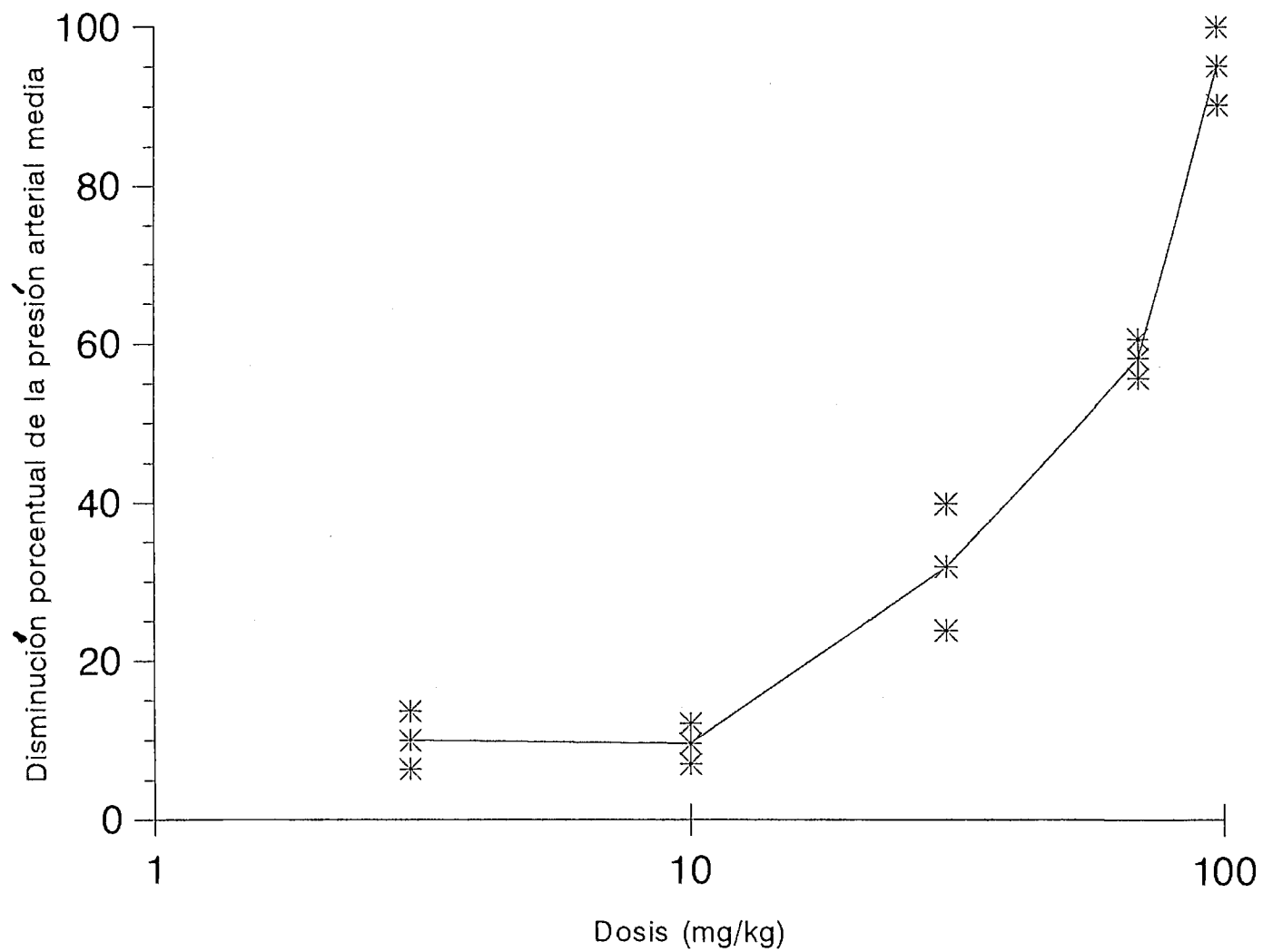


Fig.3 Relación dosis efecto hipotensor del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* administrado por vía intravenosa a ratas albinas normotensas Sprague Dawley. n=6, promedio \pm E.E.

Cuadro 12. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con la misma dosis (100 mg/kg) del extracto acuoso total y etanólico de *Pimenta dioica*.

Extracto	PAM inicial $X \pm D.E.$	PAM mínima después del extracto	Disminución Porcentual de la PAM
Acuoso total	146 ± 13	8 ± 18	95 ± 12
Etanólico	147 ± 10	48 ± 3	67 ± 3

Nota: a. X = promedio, D.E. = desviación estándar

b. PAM = presión arterial media (mmHg)

Cuadro 13. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con solución salina 0.9 % y propilenglicol al 10 %

Tratamiento	PAM inicial X ± D.E.	PAM mínima después del tratamiento	%disminución de la PAM
Solución Salina 0.9 %	115 ± 13	135 ± 13	7 ± 4
Solución Propilenglicol 10 %	145 ± 10	132 ± 4	9 ± 6

Nota: a. X = promedio, D.E. = desviación estándar
 b. PAM = presión arterial media (mmHg)

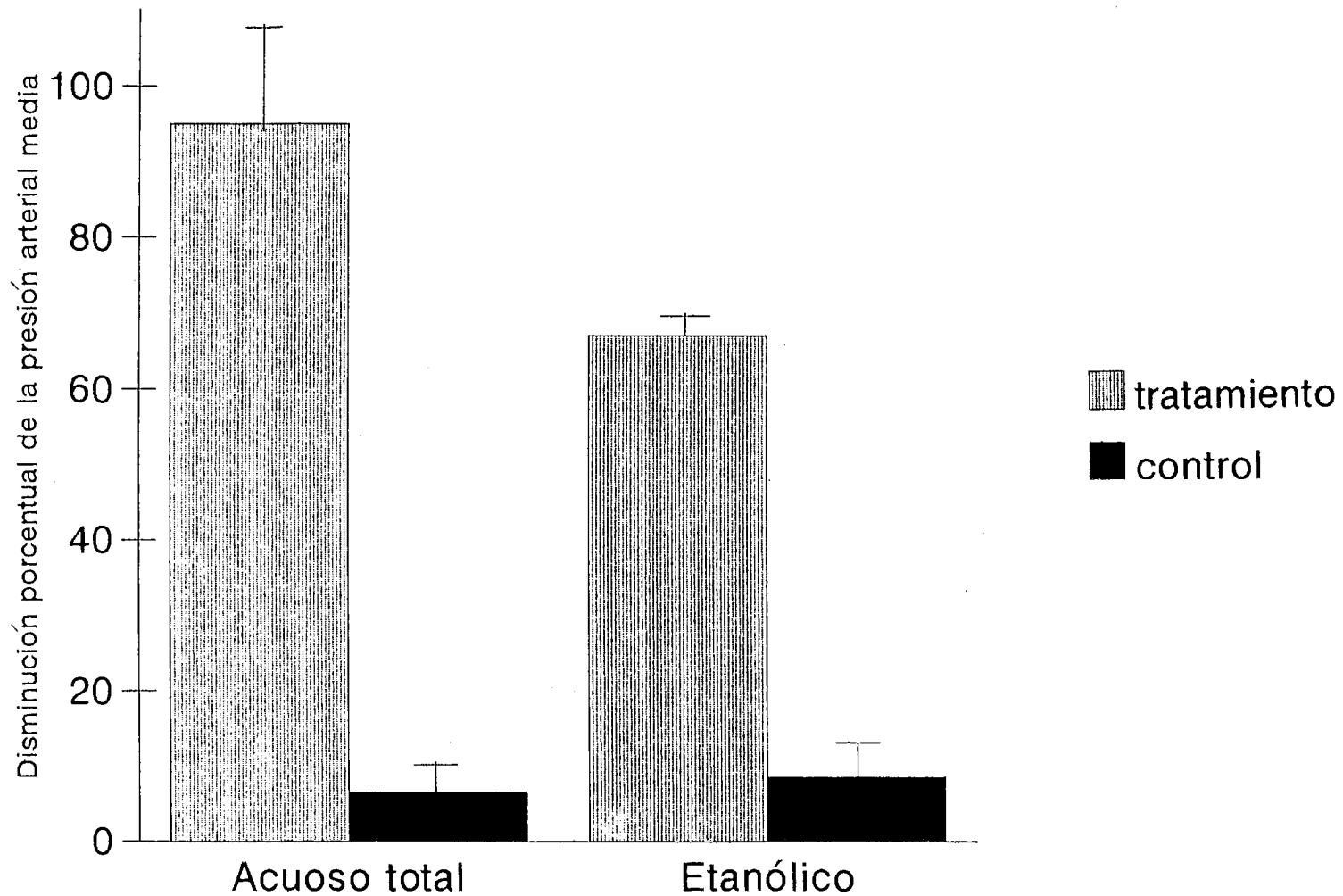


Fig. 4 Disminución porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas tratadas con la misma dosis (100 mg/kg) del extracto acuoso total y etanólico de *Pimenta dioica*

Cuadro 14. Dosis de las fracciones del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* administradas a ratas albinas normotensas Sprague Dawley por vía endovenosa

Fracción	Dosis (mg/kg)
n-butanol	16
Acetato de etilo	3
hexano	0.4
Acuoso final	30

Nota: Estas dosis son equivalentes en peso de hojas frescas a la DE_{50} del extracto total.

Cuadro 15. Cambio porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague Dawley durante 60 minutos posteriores al tratamiento con las diferentes fracciones del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

Fracción	Tiempo min									
	1	2	3	4	5	10	15	30	45	60
Acuosa final	-5.5 ± 3.0	-3.3 ± 3.5	-7.8 ± 6.2	-4.0 ± 5.1	-3.1 ± 3.8	6.4 ± 3.8	4.1 ± 4.7	5.7 ± 6.9	7.3 ± 6.8	2.7 ± 7.8
n-butanol	-6.2 ± 2.3	-1.0 ± 1.9	1.9 ± 1.5	2.5 ± 1.7	1.0 ± 1.7	2.9 ± 1.2	1.0 ± 2.1	1.9 ± 2.3	-1.0 ± 3.1	-3.6 ± 3.7
Acetato de etilo	3.0 ± 1.0	3.0 ± 1.2	2.5 ± 1.3	2.7 ± 1.5	3.0 ± 1.5	-1.0 ± 1.7	-0.7 ± 1.8	-2.1 ± 3.3	-0.3 ± 3.1	-0.9 ± 3.0
Hexano	0.3 ± 0.8	0.8 ± 0.4	0.4 ± 0.9	1.0 ± 1.1	0.6 ± 0.9	0.6 ± 1.0	-2.0 ± 1.7	0.5 ± 0.9	-2.1 ± 2.4	-0.8 ± 2.7

Nota: a. $X \pm E.E$
 X = promedio, E.E. = error estándar
 $n = 6$

b. Signo (-): indica disminución de la PAM

Cuadro 16. Cambio porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague-Dawley durante 60 minutos posteriores al tratamiento con solución salina 0.9 % y propilenglicol al 10 %

Tratamiento	Tiempo min									
	1	2	3	4	5	10	15	30	45	60
Solución Salina 0.9 %	1.5 ± 0.4	1.6 ± 0.4	0.3 ± 0.6	1.4 ± 1.0	0.4 ± 0.9	1.3 ± 0.6	-0.9 ± 1.4	-3.2 ± 1.4	-4.6 ± 2.4	-5.9 ± 1.7
PPG 10 %	3.9 ± 1.1	1.4 ± 0.9	0.1 ± 1.2	-0.6 ± 1.5	-1.6 ± 1.5	-1.7 ± 1.5	-6.1 ± 2.9	-6.9 ± 2.3	-9.3 ± 2.6	-11.5 ± 4.8

Nota: a. $X \pm E.E$
 X = promedio, E.E. = error estándar
 $n=6$

b. Signo (-): indica disminución de la PAM

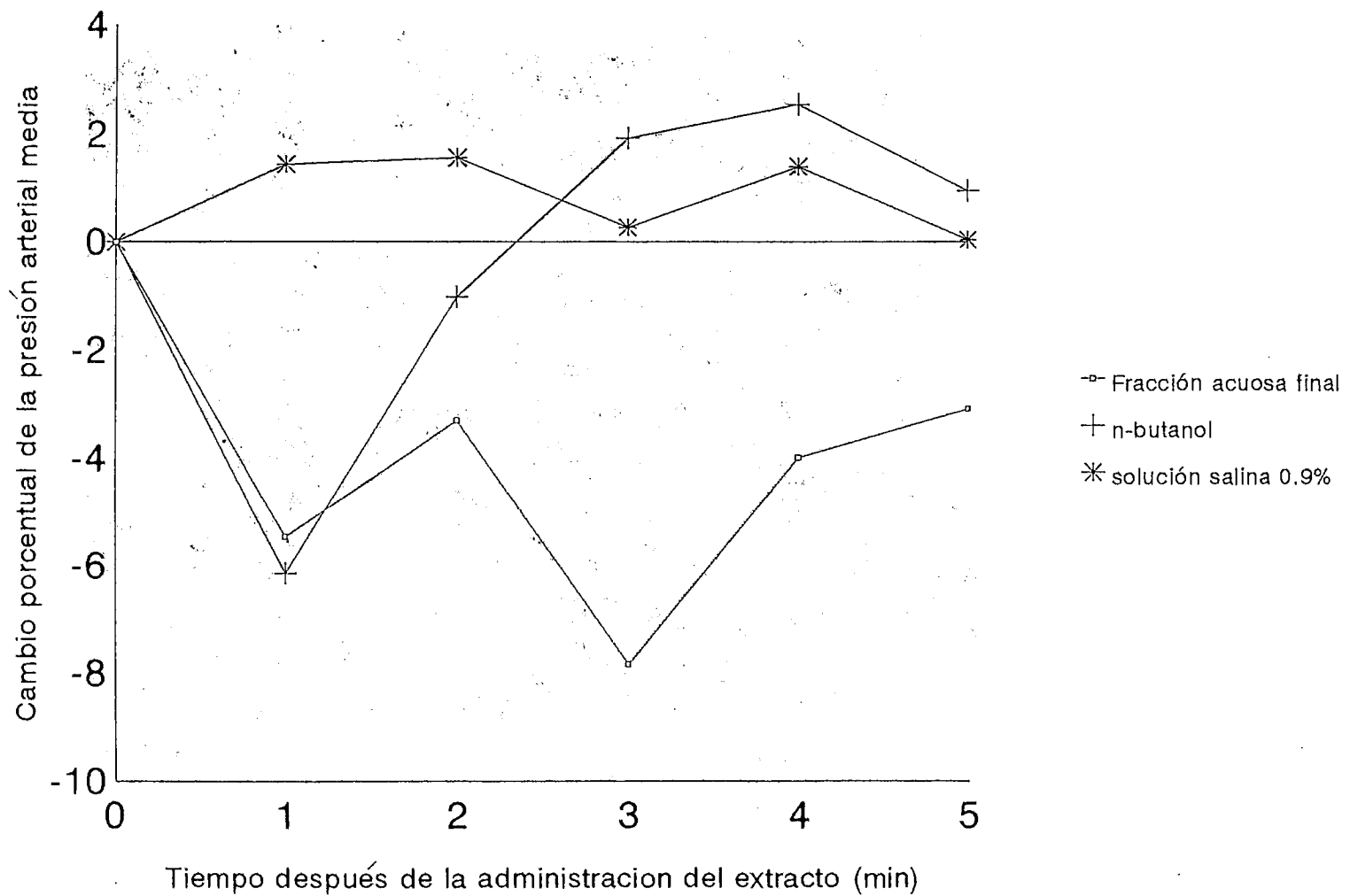


Fig.5 Cambio porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague Dawley tratadas con las fracciones n-butanol y acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

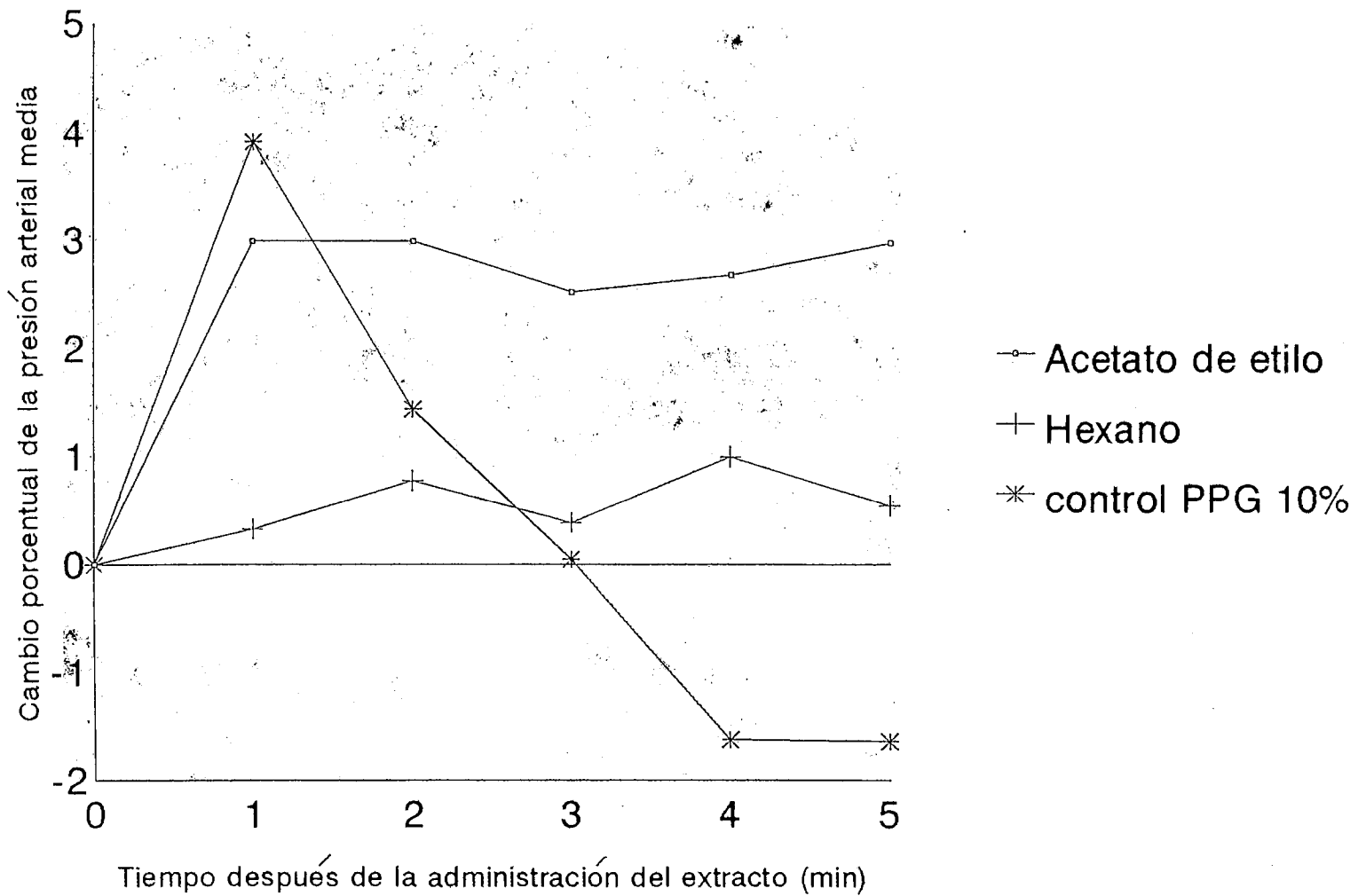


Fig. 6 Cambio porcentual de la presión arterial media de ratas albinas normotensas Sprague Dawley tratadas con fracciones en hexano y acetato de etilo del extracto acuoso de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

Cuadro 17. Matriz del GLM (General Linear Model) comparando la presión arterial media (PAM) de ratas albinas normotensas tratadas con las diferentes fracciones del extracto acuoso de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

Fracción	1	2	3	4
1 Acetato Etilo	•	0.0001	0.0005	0.1135
2 Acuoso final	0.0001	•	0.0008	0.0001
3 Hexano	0.0005	0.0008	•	0.0514
4 n-butanol	0.1135	0.0001	0.0514	•

Nota: La fracción acuosa final fue la que produjo la disminución máxima de PAM.

Los promedios de la PAM fueron: Acetato de etilo: 145.1
 Acuoso final : 132.3
 Hexano: 138.5
 n-butanol: 142.1

Cuadro 18. Efecto sobre la frecuencia cardíaca (lat/min) de ratas albinas normotensas tratadas con dosis crecientes del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* administrado por vía endovenosa

Dosis mg/kg	3	10	30	70	100
Valores de FC inicial X ± D.E.	428 ± 25	432 ± 49	432 ± 42	416 ± 54	410 ± 60
Valores al observar efecto máximo sobre PAM	412 ± 20	426 ± 43	424 ± 29	416 ± 59	52 ± 127

Nota:

- a: FC=frecuencia cardíaca
PAM = presión arterial media
- b: X = promedio
D.E. = desviación estándar
n = 6 ratas

Cuadro 19. Efecto sobre la frecuencia cardíaca (lat/min) de ratas albinas normotensas tratadas con las diferentes fracciones del extracto acuoso de *Pimenta dioica* por vía endovenosa

Fracción	F.C. inicial	F.C. al observar efecto máximo sobre PAM
Acuosa final	378 ± 28	376 ± 25
n-butanol	386 ± 35	386 ± 32

Nota:

- a: FC=frecuencia cardíaca
PAM = presión arterial media
- b: X = promedio
D.E. = desviación estándar
n = 6
- c: solo se anotan las fracciones que disminuyen la PAM.

Cuadro 20. Efecto sobre la presión arterial media (PAM) de ratas hipertensas espontáneas (SHR) tratadas con dosis crecientes de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* administrado por vía endovenosa

Dosis (mg/kg)	10	30	44	62	100
Valores de PAM inicial $X \pm D.E.$	182 ± 15	172 ± 9	172 ± 8	178 ± 15	183 ± 8
PAM mínima después de fracción	164 ± 7	124 ± 33	89 ± 22	63 ± 15	0
Disminución porcentual de la PAM	10 ± 6	29 ± 17	48 ± 12	65 ± 11	100 ± 0

Nota:

- a. X = promedio, D.E. = desviación estándar
- b. Cada valor corresponde a $n=6$

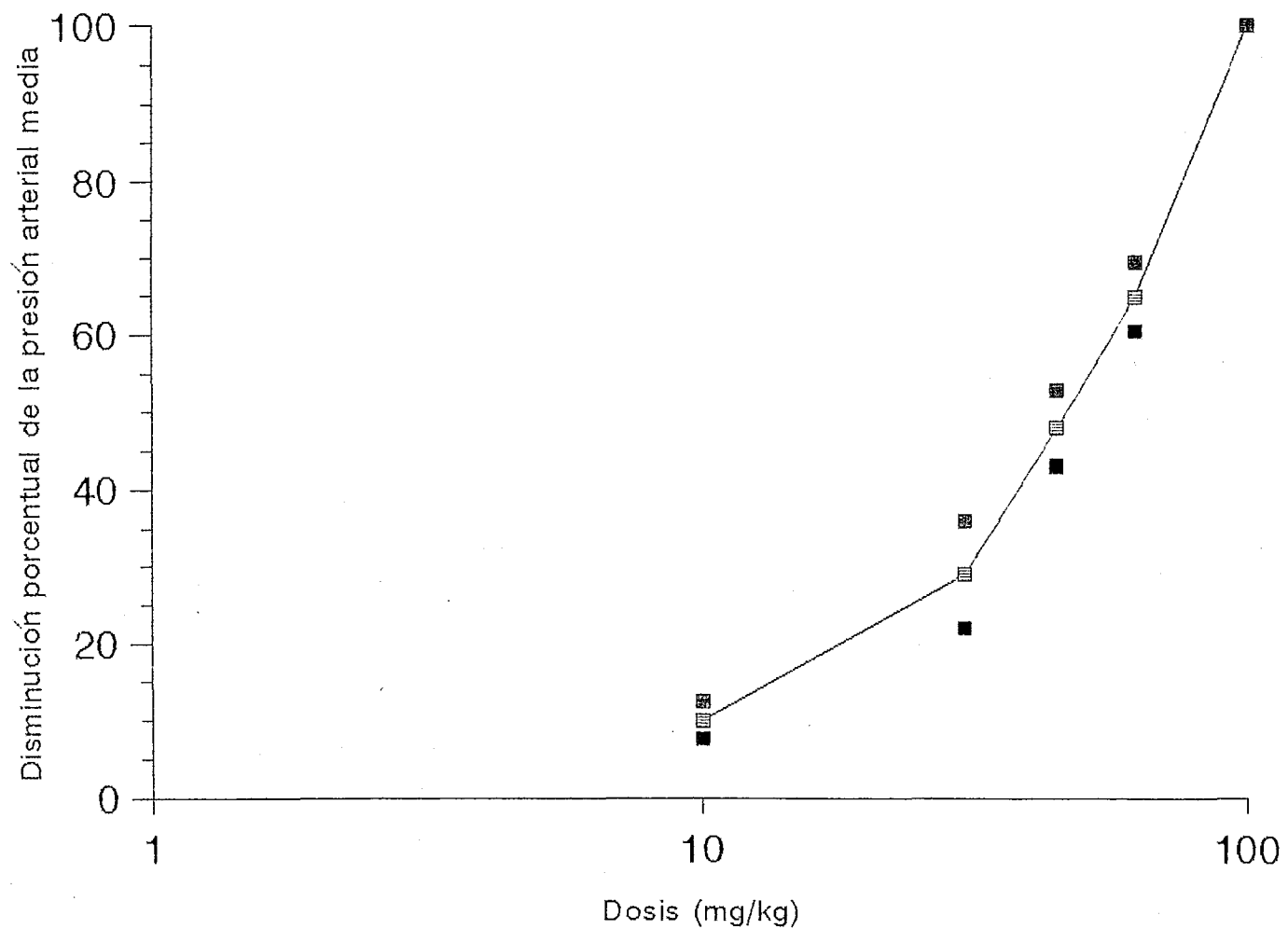


Fig.7 Relación dosis efecto hipotensor de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* administrado por vía intravenosa a ratas hipertensas espontáneas (SHR). n=6, promedio \pm E.E.

Cuadro 21. Composición iónica del extracto acuoso total de *Pimenta dioica* al 5 %

Ion	mEq/l
K ⁺	38.0
Ca ⁺²	10.8
Mg ⁺²	13.8
Na ⁺	2.4

Nota: A esta concentración se administra a las ratas al dar la DE₅₀

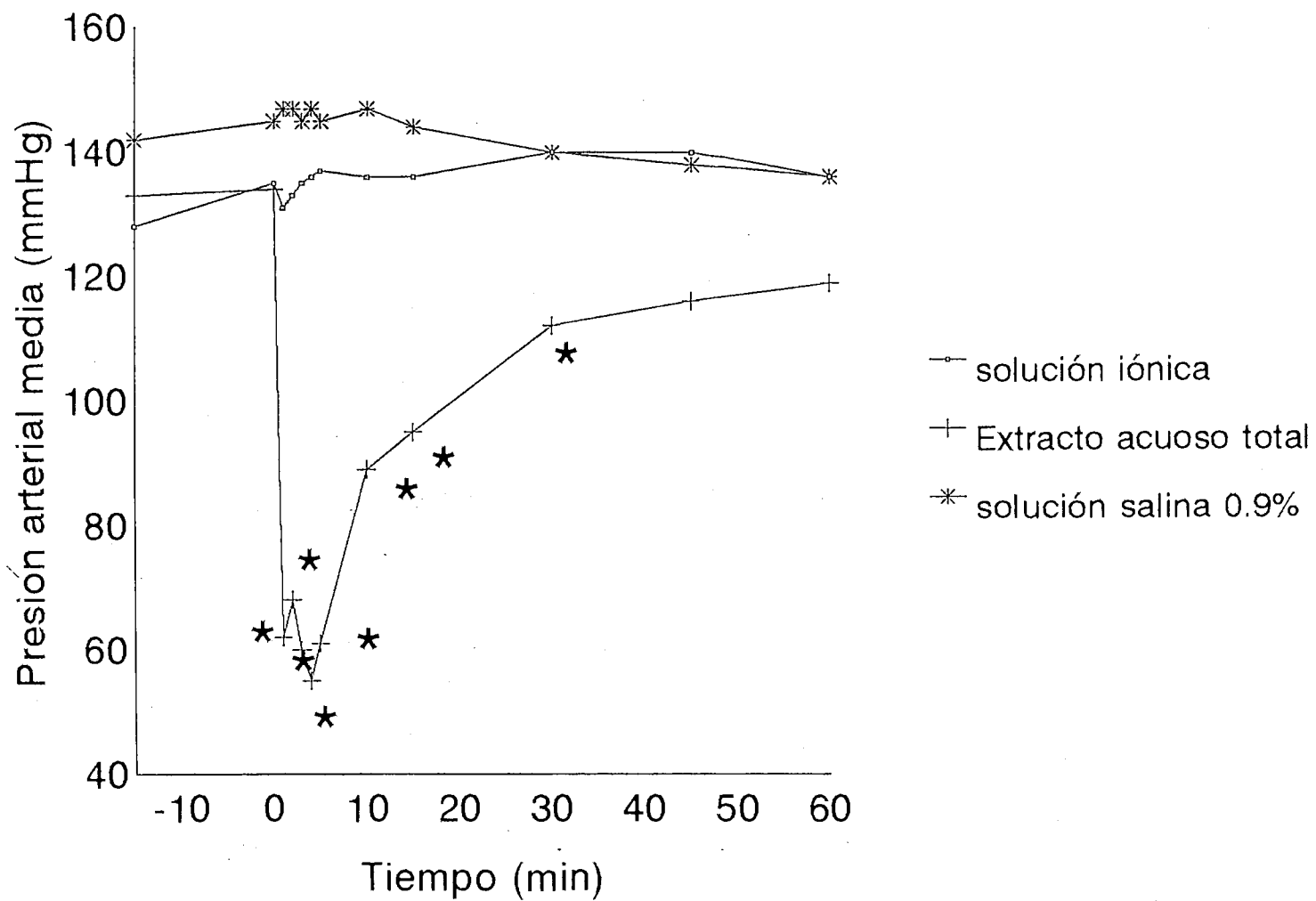


Fig. 8 Efecto sobre la presión arterial media de ratas albinas normotensas tratadas con el extracto acuoso total DE50 de *Pimenta dioica* y solución iónica con composición similar al extracto acuoso total por vía endovenosa * p < 0.05

Cuadro 22. Efecto de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*, sobre parámetros fisiológicos, en presencia de atropina, administrada intravenosamente en ratas hipertensas espontáneas (SHR)

Parámetros fisiológicos	Cambio con Acetilcolina	Cambio con ACh en presencia de atropina	Cambio con la fracción en presencia de atropina
Presión arterial media (mm Hg)	- 78 ± 8	0.0 ± 0.0	- 59.0 ± 14
Frecuencia Cardíaca (lat/min)	- 14 ± 10	0.0 ± 0.0	- 18 ± 10

- Nota:
- Los valores son el promedio ± desviación estándar
 - Se administró la DE₅₀ de la fracción acuosa final
 - Signo (-) indica disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca

Cuadro 23. Efecto de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*, sobre parámetros fisiológicos, en presencia de propranolol, administrada intravenosamente en ratas hipertensas espontáneas (SHR).

Parámetros fisiológicos	Cambio con isoproterenol	Cambio con el isoproterenol en presencia de propranolol	Cambio con la fracción en presencia de propranolol
Presión arterial media (mm Hg)	- 90 ± 9	0.0 ± 0.0	- 79.0 ± 16
Frecuencia cardíaca (lat/min)	38 ± 30	28 ± 14	- 34 ± 21

- Nota:
- Los valores son el promedio ± desviación estándar
 - Se administró la DE₅₀ de la fracción acuosa final
 - Signo (-) indica disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca

Cuadro 24. Efecto de la fracción acuosa final de *Pimenta dioica*, sobre parámetros fisiológicos, en presencia de fentolamina, administrada intravenosamente en ratas hipertensas espontáneas

Parámetros fisiológicos	Cambio con metoxamina	Cambio con metoxamina en presencia de fentolamina	Cambio con la fracción en presencia de fentolamina
Presión arterial media (mm Hg)	20 ± 6	9 ± 5	- 34 ± 13
Frecuencia cardíaca (lat/min)	- 32 ± 8	- 6 ± 3	- 20 ± 14

- Nota:
- Los valores son el promedio ± desviación estándar
 - Se administró la DE₅₀ de la fracción acuosa final
 - Signo (-) indica disminución de la presión arterial y frecuencia cardíaca

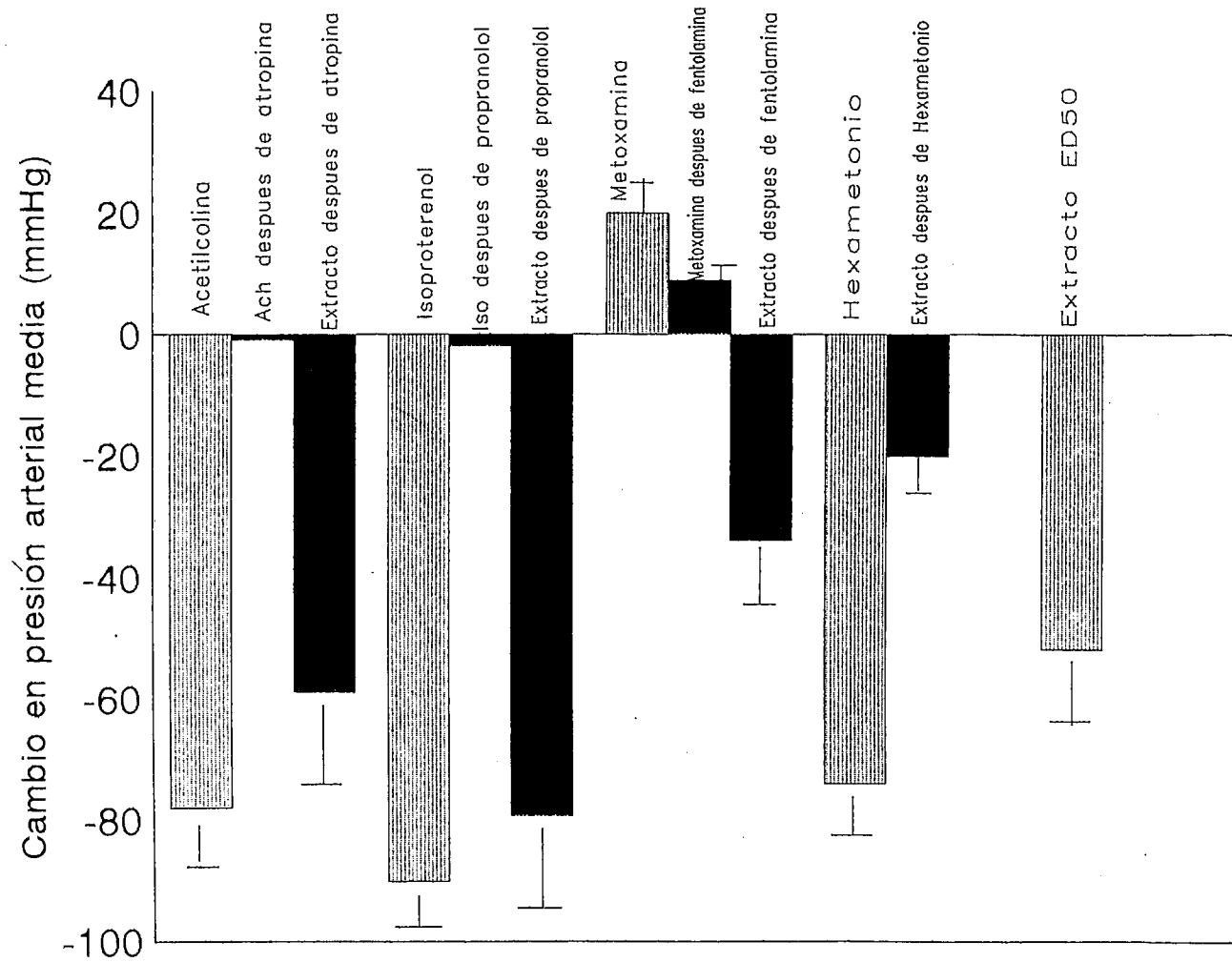


Fig.9 Cambios en la presión arterial media de ratas hipertensas al administrar la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* en presencia de atropina, propranolol, fentolamina y hexametonio

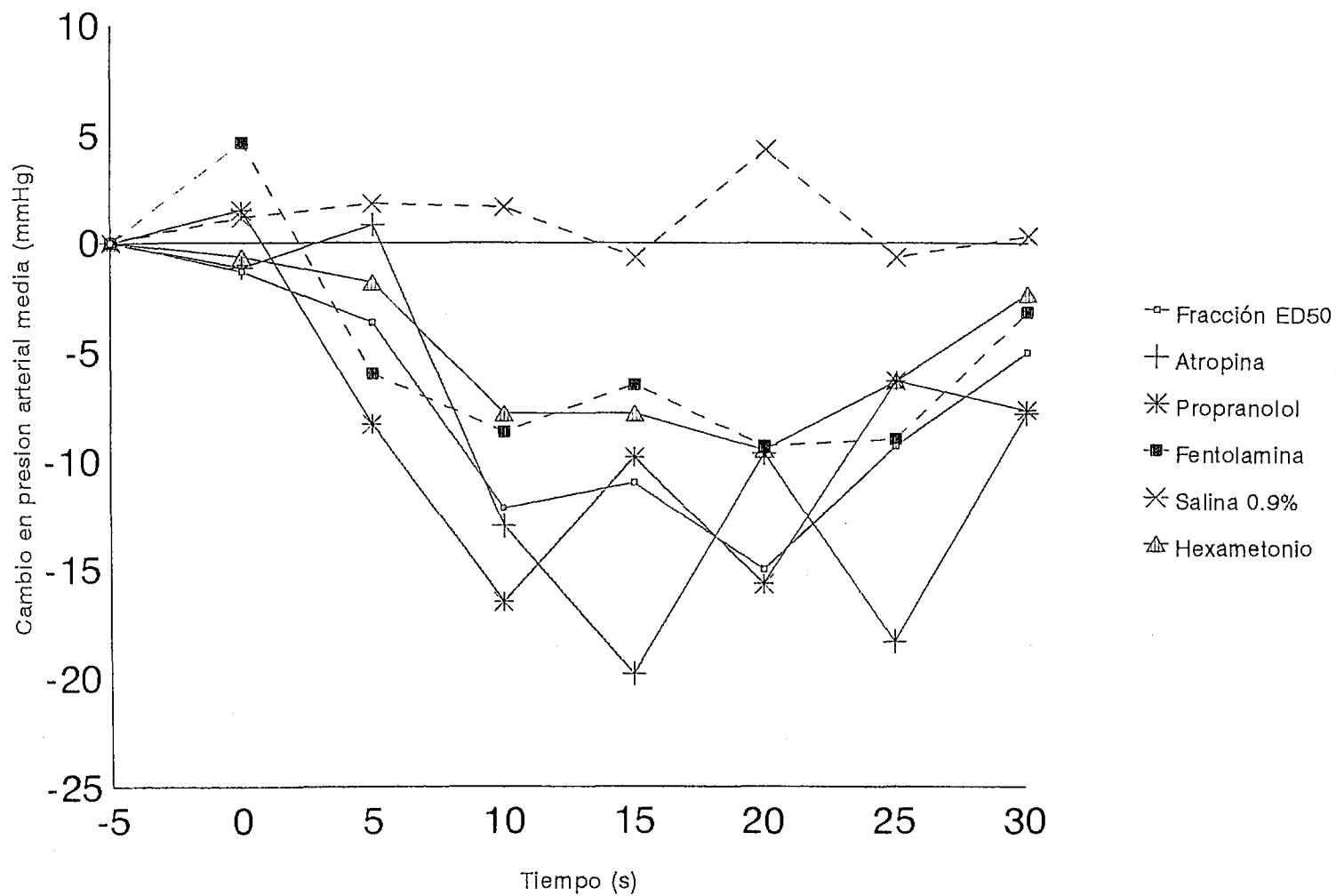


Fig.10 Cambios en la presión arterial media de ratas albinas hipertensas tratadas con la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* en presencia de atropina, propranolol, fentolamina y hexametonio por vía intravenosa

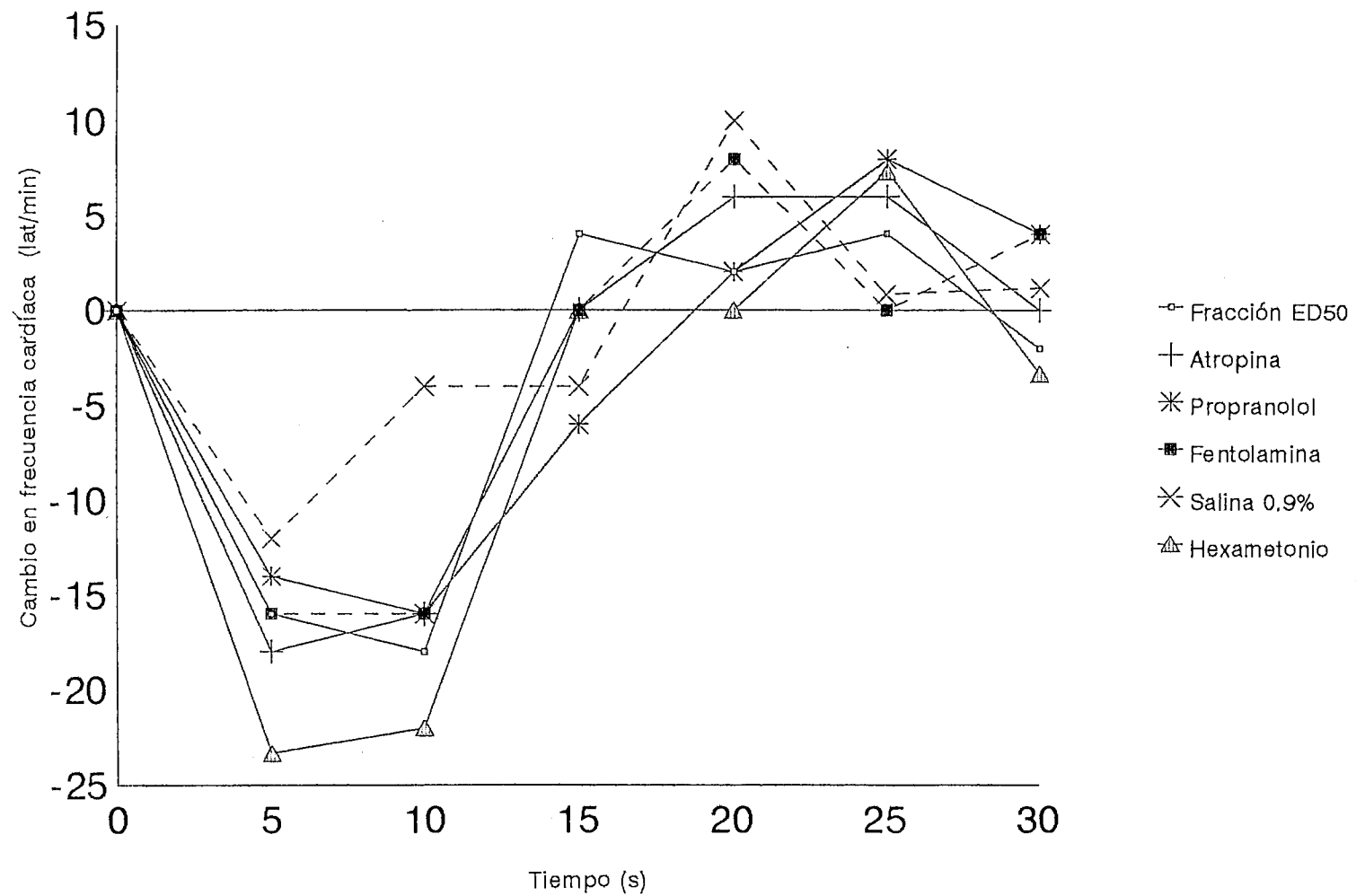


Fig.11 Cambios en la frecuencia cardíaca de ratas albinas hipertensas tratadas con la fracción acuosa final del extracto acuoso de *Pimenta dioica* en presencia de atropina, propranolol, fentolamina y hexametonio por vía intravenosa

TIEMPO⇒	Con trol	5	15	30	60	90	120	4 h	6h	24h	48h
PARÁMETROS											
OJOS											
Enoftalmia											
Exoftalmia											
Ptosis palpebral											
Tamaño de la pupila											
Nistagmus											
Lacrimación											
OREJAS											
Palidez											
Hiperemia											
Cianosis											
EFECTOS GENERALES											
Salivación											
Erección de la cola											
Erección pilomotor											
Micción											
Diarrea											
Priapismo/Colpectasia											
Signo de Robichaud											
Movimiento circular											
Temperatura rectal											
Frecuencia respiratoria											
EFECTOS SUBJETIVOS											
Agresivo											
Pasivo											
Temeroso											

OTRAS OBSERVACIONES

CONCLUSIONES, DISCUSION Y RECOMENDACIONES

Mediante la utilización del ensayo hipocrático, se documentaron efectos farmacológicos generales (depresión del sistema nervioso central) de los extractos acuoso total y etanólico de *Pimenta dioica*, en ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley).

El ensayo hipocrático orientó el fraccionamiento del extracto más efectivo (acuoso total) concluyéndose que la fracción acuosa final posee la mayor actividad biológica. Esto permite concluir que la fracción acuosa final del extracto acuoso es la más rica en las sustancias biológicamente activas por lo que debe ser mejor estudiada. Sería importante someter a esta fracción a un fraccionamiento más detallado y, siempre guiándose por los efectos biológicos, llegar a identificar químicamente la o las sustancias biológicamente activas.

Es importante destacar que la utilización del ensayo hipocrático permitió detectar otras actividades biológicas, además de los efectos cardiovasculares de los extractos de *P. dioica*, que hubieran pasado desapercibidas sin la utilización de una prueba biológica general y multidimensional.

Con el ensayo hipocrático fue posible detectar otras actividades biológicas como lo son: la analgesia y el efecto antipirético. En el futuro se sugieren estudios dirigidos a comprobar estos efectos.

También el ensayo hipocrático es valioso para estudiar, en forma inicial, los efectos tóxicos de extractos de plantas, dándonos una idea de las dosis letales (DL_{50}) sin tener que sacrificar grandes cantidades de animales.

Al administrar el extracto acuoso total de *P. dioica* por vía endovenosa a ratas albinas normotensas (Sprague-Dawley), en dosis crecientes, se observa una curva dosis-efecto

de tipo sigmoideo (Fig.3). Esto permite establecer una relación entre la dosis administrada y el efecto sobre la presión arterial media. Se puede hablar de una interacción entre una sustancia biológicamente activa y receptores celulares a través de los cuales se ejerce un efecto. La pendiente máxima de la curva se ve alrededor de una dosis de 70 mg/kg. Una dosis de 100 mg/kg produce casi el 100% de disminución de la presión arterial media, lo que da un ámbito de dosis bastante pequeño entre una dosis efectiva y una dosis letal. Su índice terapéutico es pequeño.

La DE_{50} del extracto acuoso total en ratas albinas normotensas fue de 54 mg/kg.

La actividad hipotensora del extracto acuoso total es mayor que la del extracto etanólico y la fracción acuosa final del extracto acuoso fue la más potente de las fracciones, lo que nos indica que, evidentemente, la sustancia biológicamente activa es hidrosoluble. Si bien el extracto en la medicina popular no es aplicado por vía intravenosa, esto concuerda con la forma como se prepara para su uso tradicional: un extracto acuoso.

La fracción acuosa final del extracto acuoso de *P. dioica*, al ser administrada por vía endovenosa a ratas albinas hipertensas, en dosis crecientes, produce una curva dosis-efecto de tipo sigmoidea y la DE_{50} se calculó en 45 mg/kg.

Al comparar la DE_{50} del extracto acuoso total en ratas normotensa y la DE_{50} de la fracción acuosa final en ratas hipertensas, vemos que es menor la de la fracción acuosa final en ratas hipertensas (45 mg/kg vs 54 mg/kg). Sin embargo, se hubiera esperado que la curva dosis efecto estuviera aún más desplazada a la izquierda, si el principio activo se hubiera concentrado en forma importante en la fracción acuosa final. Las demás fracciones del extracto acuoso final no tienen tanto efecto hipotensor (*n*-butanol) o lo perdieron totalmente (acetato de etilo y hexano). La sustancia biológicamente activa sí está presente en la fracción acuosa final pero su potencia no es la esperada. Esto podría deberse a pérdida de principios activos durante el fraccionamiento que contribuyen, junto con el principio activo de la fracción acuosa final, con la

producción del efecto hipotensor pero que al encontrarse aislados en las otras fracciones no presentan actividad biológica importante.

Durante la administración oral, por 14 días, de la fracción acuosa final del extracto acuoso de *P.dioica* a ratas normotensas e hipertensa no se observó efecto alguno sobre el peso, la presión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca. La sustancia biológicamente activa por vía endovenosa no se absorbe adecuadamente por vía oral o su efecto es muy pasajero y la dosificación debe de ser mayor y más frecuente. También cabe la posibilidad de que se inactiva por las secreciones gástricas e intestinales, o que se inactive por el hígado antes de llegar a la circulación general.

Para estudiar la posibilidad de que la actividad hipotensora del extracto acuoso y de la fracción acuosa final de *P.dioica* pudiera deberse a factores inespecíficos y no a sustancias biológicamente activas presentes en los extractos se hicieron pruebas administrando por vía endovenosa un solución iónica de composición similar a la DE_{50} del extracto acuoso total. En ningún momento se observó disminución de la presión arterial media de las ratas que recibieron la solución iónica, a pesar de que su concentración de K^+ es de 38 mEq/l. No obstante el volumen administrado de la solución iónica y de los extractos fue pequeño (1ml/kg) lo que pudo contribuir a que no se afectara la función cardiovascular (Fig 9).

La acción hipotensora inicial del extracto (observada durante el primer minuto después de la administración del extracto) se acompañó de bradicardia, la cual probablemente no es la causa de la hipotensión, ya que también se observa en el grupo de ratas que se le administró solución salina al 0.9%. Estas ratas, a pesar de presentar la misma bradicardia inicial, no presentaron el descenso en la presión arterial (Fig.11).

El extracto probablemente tampoco afecta el componente cardíaco del baroreflejo, ya que, posterior a su administración, se observa una taquicardia refleja (Fig 12) y un aumento continuo de la frecuencia cardíaca hasta valores máximos 5-10 minutos

posteriores a la administración del extracto.

A pesar de esta taquicardia refleja, la hipotensión persiste, por lo que se podría proponer un efecto sobre vasos sanguíneos.

Al administrar el extracto en presencia de fentolamina, se observó una disminución de la presión arterial media que no fue diferente, estadísticamente, de la hipotensión provocada por el extracto sin bloqueo, lo que descarta un estímulo de receptores α_2 adrenérgicos presinápticos periféricos.

También se descarta que el extracto produzca hipotensión por estímulo de receptores β_2 ya que, en presencia de propranolol, se produjo un descenso de la presión arterial media, estadísticamente no diferente de la producida por el extracto sin bloqueo.

Si el extracto ejerciera un efecto bloqueador de receptores β cardíacos no se hubiera observado la taquicardia refleja posterior a la administración del mismo.

El extracto tampoco presenta un efecto muscarínico directo ya que al darlo en presencia de atropina siempre se produce la misma disminución de la presión arterial media (Fig.11).

En la presencia de un bloqueador ganglionar (hexametonio), el extracto disminuye su efecto hipotensor de manera significativa $p < 0.05$ (Fig.3). Que el extracto produzca un bloqueo ganglionar es poco probable ya que se hubiera observado un bloqueo de vías reflejas cardiovasculares y esto no sucedió. El bloqueador ganglionar produce una disminución del tono arteriolar con disminución de la presión arterial y si el extracto se administra en estas condiciones puede no manifestarse su efecto hipotensor ya que la vasodilatación previa es muy significativa.

En ningún momento durante la realización del trabajo se observaron anomalías en el electrocardiograma.

Todo esto permite deducir que probablemente el extracto tiene una acción directa sobre el músculo liso vascular, produciendo vasodilatación y disminución de la presión arterial media.

Estudios posteriores con anillos de aorta y baño de órgano son necesarios para verificar el mecanismo de acción propuesto.

ANEXO F
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Akerele, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. Fitoterapia. LIX (5): 355-363, 1988.
2. Arena, J.M. Plantas venenosas. Tribuna Médica. 350 (31):11-24, 1982.
3. Asprey, G.F. , and P. Thornton. Medicinal plants of Jamaica. Part I. West Indian Med. J. 24: 233-252, 1953.
4. Berne, R.M, and M.N. Levy. Physiology. ed. Berne, R.M., and M.N. Levy. (3rd ed.). Missouri: Mosby year Book, 1993, p.453-464.
5. Campos, H. Prevalence of cardiovascular risk factors in rural and urban Costa Rica. Circulation. 85: 648-658, 1992.
6. Domínguez, X.A., P. Rojas, M.D.R. Garza , and J.A. Córdova. Preliminary study of 25 plants from the central territory of Quintana Roo, México. Rev. Soc.Quim. Mex. 6: 213-215, 1962.
7. Escohotado, A. Las drogas, de los orígenes a la prohibición. Madrid: Alianza Editorial, 1994, p. 5-11.
8. Farnsworth, N.R. Banco de datos computadorizado para plantas medicinales. Foro Mundial de la Salud. 6: 89-94, 1984.

9. Farnsworth, N.R., O. Akerele, A.S. Bingel, D.D. Soejarto, and Z. Guo. Las plantas medicinales en la terapéutica. Bol Oficina Sanit Panam. 107 (4): 314-329, 1989.
10. Fernández, M., and A. Nieto. Plantas Medicinales. Pamplona: Ediciones Universidad Navarra S.A., 1982, p. 9-10.
11. Frohlich, E.D. Is the spontaneously hypertensive rat a model for human hypertension? J. Hypertens. 4(3): S15-S19, 1986.
12. García, M. 1990. Efectos cardiovasculares del extracto acuoso y dos fracciones, de *Clusia coclensis*, D'Arcy administrado en ratas albinas normotensas e hipertensas. Tesis de Maestría. Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica.
13. García, A. Plantas de la Medicina Bribrí. San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 1990, p. 11-17.
14. Germosén-Robineau L. Hacia una Farmacopea Caribeña (7 ed.). Santo Domingo: Tramil, 1995, p. 693,481-483.
15. Goodman-Gilman, A. , T.W. Rall, A.S. Nies, and P. Taylor. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (8th ed.). New York: Pergamon Press, 1991, p. 784-813, 49-61.
16. House, P.R., S. Lagos-Witthe, L. Ochoa, C. Torres, T. Mejía, and M. Rivas. Plantas medicinales comunes de Honduras. Tegucigalpa: Litografía López, 1994, p.345.

17. Lovenberg, W.. The importance of rat models in hypertension research. J. Hypertens. 4(3): S3-S6, 1986.
18. Ministerio de Economía, Industria y Comercio. Dirección General de Estadística y Censos. Estadísticas Vitales 1993: población, nacimientos, defunciones, matrimonios. San José: Publicaciones DGEC, 1993, p.76.
19. Núñez, E. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore, San José: Editorial Universidad de Costa Rica, 1982,p. 67-93.
20. Ocampo, R.A., T. Palma, and N. Hidalgo. Diagnóstico de Costa Rica.Domesticación de Plantas medicinales en latinoamérica, Turrialba: CATIE. Serie técnica, 1994,p. 50-59.
21. Rogers, Mc. Flora de Guatemala. Fieldiana Bot. 24: 382-385, 1963.
22. Romero, M. 1989. Acción cardiovascular de extractos acuosos de hojas de *Syzygium jambos* (L.) Alston. Tesis de Maestría. Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica.
23. Salas, I.G. 1985. Mecanismo de acción cardiovascular de los extractos frescos liofilizados de *Cecropia obtusifolia*, Bertol. Tesis de Maestría. Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica.
24. Vargas, S. Plantas medicinales: la naturaleza como guardián de su salud. San José: Imprenta y Litografía Mundo Gráfico, 1990, p. 55.

25. Vidrio, H., and G.A Magos. Pharmacolgy of *Casimiroa edulis*; Part I. Blood pressure and heart rate effects in the anesthetized rat. Planta Med. 57: 20-24, 1991.
26. Vidrio, H., and G.A Magos. Pharmacolgy of *Casimiroa edulis*; Part II. Cardiovascular effects in the anesthetized dog. Planta Med. 57:217-220, 1991.
27. Wintrobe, M.M., G. W. Thorn, R.D. Adams, I.L. Bennett, E. Braunwald, K. J. Isselbacher, and R.G. Petersdorf. Harrison Principios de Medicina Interna (11 ed.). México: Interamericana. McGraw-Hill, 1989, p.193-194, 1261-1276.
28. Wendelberger, E. Pequeña guía de las plantas medicinales. Barcelona:Ediciones Omega S.A.,1981, p. 6-9.