

Estudio toxicológico y fitoquímico de *Pernetia coriacea* Klotzsch

por

J. A. Sáenz*

y

Maryssia Nassar*

(Recibido para su publicación el 2 de Mayo de 1967)

En ciertas zonas altas de Costa Rica, particularmente entre 2.400 y 4.000 m de altura, se encuentran asociadas tres especies: *Vaccinium consanguineum* Klotz., *Myrtus oerstedii* (Berg) Hemsl. y *Pernetia coriacea* Klotz., que corrientemente reciben el mismo nombre de "arrayán" (1, 3, 8, 9, 14). En el pueblo existe el conocimiento de que algunos de sus frutos son venenosos; en el campo resulta difícil distinguirlas debido a su gran parecido morfológico, y al tamaño, color, forma y sabor de los frutos.

De los tres géneros señalados, el que menos atención ha recibido desde todo punto de vista, es *Pernetia*. PITTIER (9) indica que ninguno de los llamados "arrayanes" tiene un uso que lo distinga. La única referencia encontrada sobre el posible efecto tóxico de los frutos de *P. coriacea* está en la Flora de Costa Rica (13) texto en el que se indica que Pittier creía que los frutos podrían ser tóxicos. De la bibliografía extranjera consultada, se desprende que no existe referencia sobre el efecto tóxico de los frutos de *P. coriacea*, mientras que sí hay anotaciones sobre el uso en confituras de los frutos de especies de los géneros *Vaccinium* y *Myrtus* (3). En otros países se citan como "arrayanes" a especies de otros géneros (4, 7, 10).

Los vecinos de uno de los lugares en donde se encuentra *P. coriacea* indican que varios niños se han intoxicado al ingerir frutos de esa especie, caracterizándose el efecto por vómitos y "pérdida de la fuerza", al no poder caminar. Igual observación hacen profesores y jefes de "Boy Scouts" que han realizado excursiones con jóvenes a las montañas altas.

Incidentalmente nos enteramos de dos casos de intoxicación en humanos, por haber ingerido frutos de un "arrayán" localizado en la zona del "Cerro de la

* Depto. de Biología, Universidad de Costa Rica.

Muerte', Carretera Panamericana, así como de las vecindades del Volcán Poás. En uno de esos casos y en una misma residencia una señora y un perro se intoxicaron con un pastel hecho a base de fruto de uno de esos "arrayanes". A la señora le produjo vómito y hemiplejía, y al perro vómito y parálisis, particularmente del tren posterior.

Estos informes nos llevaron a investigar la acción tóxica de dichos frutos.

Tiempo después de haber iniciado este trabajo recibimos información sobre otro caso de intoxicación, que nos comunicó personalmente el botánico belga M. Jacques Jangoux, quien ingirió algunos frutos en las vecindades del Volcán Poás. Los efectos aparecieron aproximadamente en una hora. Los síntomas, según su propia descripción, fueron: mareo, astenia, malestar en los hombros y fotofobia. Un recorrido que normalmente hacía en 45 minutos lo realizó en esa oportunidad en 3 1/2 horas aproximadamente, debido al cansancio que sentía en las piernas al hacer esfuerzo.

MATERIALES Y METODOS

Al inicio, debido a la ambigüedad de los informes, tuvimos que utilizar las tres especies de "arrayanes". Se emplearon frutos frescos de *P. coriacea*, *V. consanguineum* y *M. oerstedii*, colectados en el Cerro Jaboncillo y Cerro de la Muerte, Cordillera de Talamanca, a alturas entre 2.200 y 3.300 m la primera, y en el Volcán Poás las dos últimas, a 2.704 m.

En los ensayos se utilizaron 14 ratones, 44 ratas blancas, 1 conejo y 6 perros habiéndose realizado un total de 11 pruebas.

Experimento 1: Se preparó extracto con frutos desintegrados en licuadora y luego filtrados, de cada una de las especies de "arrayán". Se tomaron 3 grupos de 3 ratas, con un peso promedio de 160 gm y a cada uno se le administró, como única dieta uno de los 3 extractos. Este experimento se repitió. Se practicó análisis alcaloidal, según procedimiento descrito (11) de hojas y frutos de *P. coriacea*.

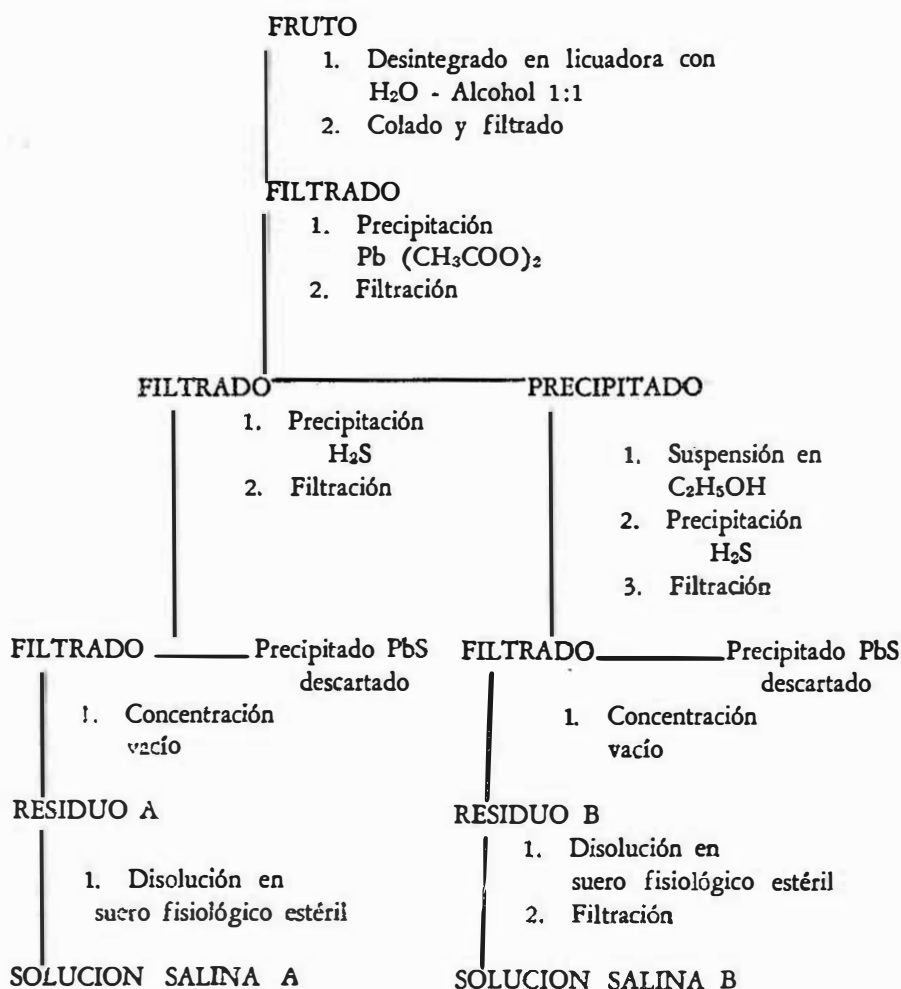
Se procedió luego a fraccionar de la siguiente manera: 15 gm de fruto fresco de cada especie por separado se desintegraron en licuadora utilizando agua como solvente; la mezcla obtenida en cada caso se filtró empleando vacío y el filtrado se precipitó totalmente con solución saturada de subacetato de plomo; se filtró y se separó tanto el filtrado como el precipitado. Al primero se le pasó H₂S hasta precipitación total y al segundo se le agregó alcohol de 95° y se le sometió al mismo tratamiento. Las suspensiones se filtraron para separar el sulfuro de plomo y se obtuvieron así los filtrados A y B de los frutos de cada "arrayán", que se calentaron en baño de maría para eliminar el exceso de H₂S. Los respectivos filtrados A y B se evaporaron hasta sequedad en baño de maría y los residuos A y B de cada especie se diluyeron en 10 ml de sol. salina estéril para obtener los tres grupos de soluciones A y B correspondientes a cada "arrayán".

Experimento 2: Se emplearon ratas con pesos comprendidos entre 159 y 182 gm, divididas en 3 grupos. A 2 ratas de cada grupo se les inyectó intraperitonealmente 0.35 ml y 2 ml respectivamente, de sol. A de uno de los "arra-

yanes". Se escogieron 3 grupos de 3 ratas y se les inyectó a cada rata de cada grupo una de las siguientes dosis: 0.65 ml, 1 ml, y 1.5 ml de las respectivas soluciones B. De aquí en adelante se continuó trabajando únicamente con los frutos de *P. coriacea*.

Experimento 3: Se tomaron aproximadamente 2.5 ml de sol. A y un conejo de 3 kilos. Primero se inyectó 0.5 ml. en la vena media de la oreja y, a los 15 minutos 2 ml por vía intraperitoneal.

Se hizo una nueva extracción utilizando 755 gm de fruto fresco, de *P. coriacea* siguiendo los pasos que se indican a continuación.



Experimento 4: Aproximadamente 1.5 gm de residuo A se disolvió en agua destilada estéril y se inyectó a cada rata, de un grupo de 4, intraperitonealmente, una de las siguientes dosis: 0.25 ml; 0.50 ml; 0.75 ml y 2 ml. La rata que recibió 2 ml se disectó extrayéndosele los siguientes órganos: corazón, hí-

gado, bazo, riñones, pulmones y médula; se fijaron en formalina al 5 % y se hicieron cortes de 6 μ teñidos con hematoxilina-eosina.

Se procedió a hacer una cromatografía, con el resto del residuo A, en una columna de 38.5 cm \times 3 cm, con alumina Merck lavada al ácido. La columna se trató previamente con acetato etilo-hexano 1:1 y se obtuvieron 7 fracciones lavando con mezclas de acetato etilo-hexano-cloroformo; acetato etilo-alcohol; alcohol-agua.

Experimento 5: Se tomaron 7 ratas con un peso promedio de 215 gm y se numeraron, al igual que las fracciones cromatográficas, de I a VII.

Se inyectó a cada una la fracción correspondiente diluida a 1 ml. La fracción III se analizó por cromatografía en papel Whatman N° 1 según procedimiento descrito para azúcares o glicósidos reductores (2). Una vez determinada la posición y el número de las manchas se procedió a lavar tiras de papel sin revelar a fin de ensayar en ratones cada una de las sustancias encontradas.

Experimento 6: Se tomaron 4 ratones con un peso mínimo de 53.5 gm y máximo de 65 gm. Se inyectó intraperitonealmente a cada ratón de un grupo de 3, el lavado de una de las manchas equivalente a 0.5 ml y, a un cuarto ratón, el lavado del frente del solvente.

Experimento 7: Se utilizaron 3 perros con un peso entre 8 y 10 kg y se les administró por vía oral una carne preparada por cocimiento, con aproximadamente 1 libra de frutos de *P. coriacea*.

Finalmente se procedió al aislamiento del principio activo, extrayendo 15 libras de fruto fresco, de acuerdo con los pasos descritos anteriormente hasta obtener el residuo A y prosiguiendo como se indica en el cuadro sinóptico 2.

Experimento 8: Se tomó 1 mg del principio activo y se disolvió en 1 ml de agua destilada estéril. Se inyectó intraperitonealmente 0.1 ml a 2 ratones de aproximadamente 65 gm. De la misma solución se tomó 0.1 ml y se diluyó a 1 ml con agua destilada estéril, inyectando intraperitonealmente 0.1 ml de esta nueva dilución a otros 2 ratones de peso similar. Se hicieron varias cromatografías del principio obtenido en capa delgada de sílica, utilizando varios solventes simples: éter, cloroformo, benceno, butanol, etanol, metanol y agua, así como mezclas en proporciones variadas de los mismos solventes.

Se encontraron las manchas asperjando con H₂SO₄ al 50 %. También se hizo cromatografía ascendente en papel para determinar azúcares (2, 5). Se intentó hidrolizar el principio (2).

Experimento 9: Utilizando 2 perros de aproximadamente 6 kg se administró a uno de ellos por vía oral, 3.5 mg del principio activo y, al otro, 1 gm del residuo B₁ ambos mezclados con carne molida cruda.

Experimento 10: Se prepararon las siguientes soluciones:

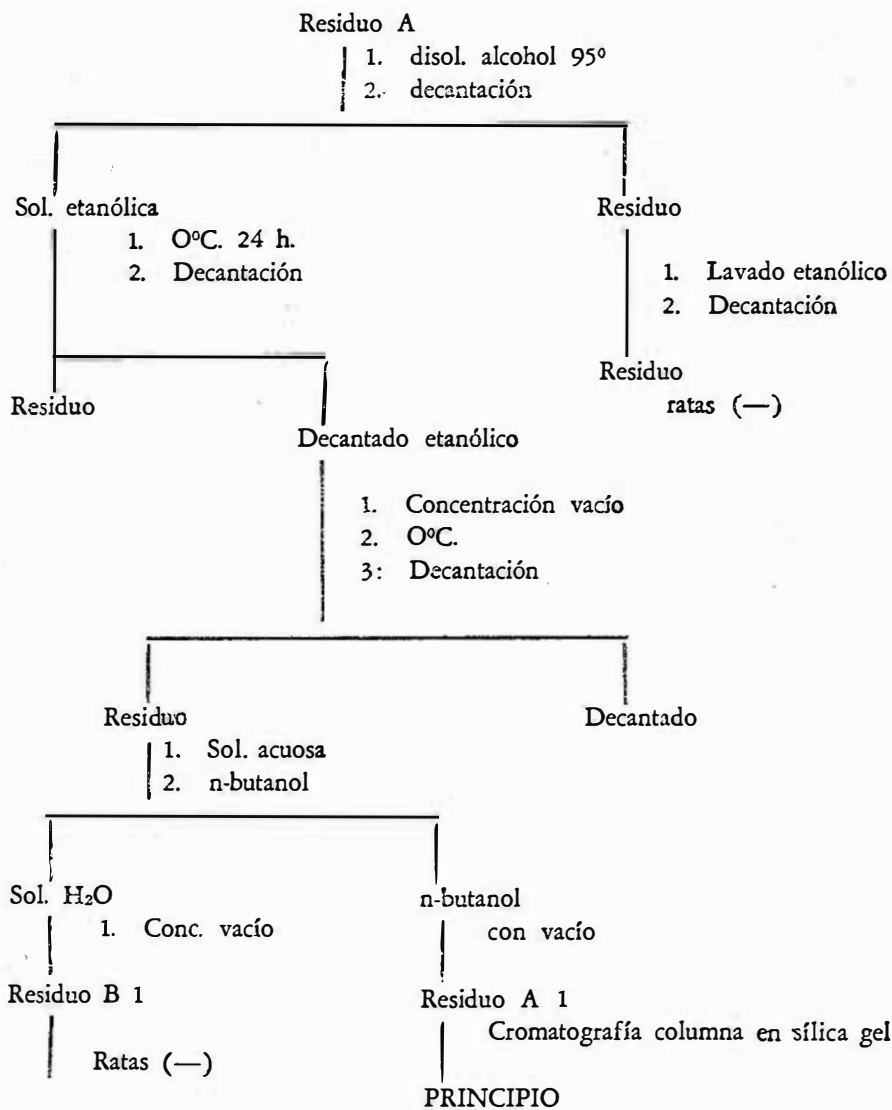
Solución N° 1: 1 mg principio activo en 1 ml de agua destilada estéril.

Solución N° 2: 1 mg principio activo en 1.5 ml de agua destilada estéril.

Solución N° 3: 1 mg principio activo en 2 ml de agua destilada estéril.

Solución N° 4: 1 gm residuo B₁ en 1 ml de agua destilada estéril.

CUADRO SINOPTICO 2



Solución Nº 5: 0.1 ml sol. 3 + 0.1 ml sol. 4.

Se utilizaron 5 ratones numerados igual que las fracciones. A cada ratón se le inyectó intraperitonealmente 0.1 ml de la solución correspondiente.

Se determinó al principio activo, denominado tentativamente pernetina, punto de fusión y se practicó análisis elemental así como características de solubilidad (6).

RESULTADOS

Las ratas del experimento 1, alimentadas con extractos de frutos de *V. consanguineum* y *M. oerstedii* no presentaron ninguna alteración fisiológica ostensible. Sin embargo las que fueron alimentadas con extracto de *P. coriacea* manifestaron los primeros síntomas de intoxicación a los 10 minutos de haber ingerido el extracto. Los efectos, al igual que en los casos de intoxicación comunicados en humanos, fueron reversibles y al cabo de 4 horas los animales se recuperaron.

El análisis alcaloidal de las fracciones ácida-alcalina de fruto y hoja de *P. coriacea* resultó negativo (12).

La repetición del experimento 1 efectuado en las mismas condiciones dio el mismo resultado.

Experimento 2:- Las ratas a las que se administró intraperitonealmente soluciones A y B de *V. consanguineum* y *M. oerstedii* no presentaron ninguna alteración, mientras que, las inyectadas con solución A de *P. coriacea* mostraron los síntomas característicos de la intoxicación. La solución B de esta última especie resultó inocua.

En las ratas, el efecto catalogado como positivo se manifiesta, por vía intraperitoneal, al cabo de pocos segundos hasta 4 minutos, dependiendo de la dosis inyectada. Los síntomas característicos en todos los animales tratados y que se tomaron como base para considerar positivo el experimento son los siguientes: palidez de las áreas descubiertas; espasmos gástricos con vómito y fuerte salivación y finalmente afección del sistema locomotor, especialmente del tren posterior. Las patas de los animales afectados responden a estímulos sensoriales por lo que aparentemente el efecto es inhibitorio de la acción motora.

Experimento 3: El conejo presentó con ambas inyecciones fuerte salivación y espasmos gástricos, aunque la afección del sistema locomotor es más difícil de observar en este animal.

Experimento 4: La rata que recibió 2 ml presentó síntomas violentos y murió a los pocos minutos. Las otras 3 manifestaron los síntomas ya descritos para la intoxicación. El estudio microscópico de los cortes de órganos mostró pulmones e hígados ligeramente hemorrágicos aunque ninguna alteración histológica.

Experimento 5: De las 7 fracciones cromatográficas inyectadas, solamente la III dio resultado positivo. La cromatografía en papel de esta fracción evidenció que tenía 3 sustancias reductoras las que, una vez lavadas, se utilizaron en el experimento 6: los ratones inoculados con cada una de las sustancias reductoras encontradas en las cromatografías de papel, no evidenciaron intoxicación; sin embargo los ratones inyectados con el lavado de la parte próxima al frente del solvente en las tiras de papel sí lo hicieron, con lo que resultó ser responsable de la actividad; no tiene propiedades reductoras.

Experimento 7: Los perros manifestaron los síntomas siguientes: vómito a los pocos minutos de haber ingerido el alimento mezclado con fruto; espasmos a nivel de la garganta; sed excesiva. A las 5-6 horas presentaban síntomas aná-

logos a los de las ratas: alteraciones en el tren posterior que se mantiene desviado hacia el lado izquierdo del cuerpo. Los efectos se hacen más evidentes cuando el animal permanece inmóvil por un corto tiempo y luego trata de caminar. Los síntomas en el tren posterior se mantuvieron por más de 10 horas. A las 18 horas todos los animales se recuperaron.

Experimento 8: Los 2 primeros ratones inyectados con la solución del principio activo sin diluir murieron violentamente. Los otros 2 inyectados con solución diluida mostraron todos los síntomas ya descritos; uno de ellos murió a los 5 minutos mientras que el otro se recuperó.

Se obtuvo 95 mg del principio activo cristalizado. Las cromatografías en capa delgada indican que se trata de una sola sustancia y las de papel mostraron ausencia de azúcares. Las tentativas de hidrólisis resultaron infructuosas.

Experimento 9: El perro al que se administró 3.5 mg del principio activo vomitó a las 5 1/2 horas y, a las 6 horas después de la ingestión empezó a perder el control del tren posterior. Así se mantuvo por espacio de 2 horas, presentando además fuerte salivación. El residuo B₁ administrado al otro perro resultó inocuo.

Experimento 10: Las soluciones 1, 2, 3 y 5 resultaron ser fuertemente activas, sobreviviendo únicamente el ratón inoculado con la solución 5. La solución 4 resultó inocua.

El análisis elemental del principio activo fue negativo para azufre, nitrógeno y halógenos. Su punto de fusión es de 210° C con descomposición. Es soluble en metanol, etanol, n-butanol y, ligeramente soluble en agua. Insoluble en éter etílico, cloroformo y demás solventes orgánicos. Físicamente se presenta como un polvo blanquecino, amorfo, cristalino, de olor suave y de sabor amargo y quemante.

CONCLUSIONES

Las diferentes experiencias efectuadas en ratas, ratones y perros confirman el poder tóxico de los frutos de *P. coriacea* Klotz. La sintomatología en animales de laboratorio es similar a la informada para humanos. El principio aislado demuestra ser muy activo ya que pequeñas dosificaciones, en el orden de los centésimos de milígramo, son suficiente para provocar la muerte de ratones. Se confirmó además, la suposición de PITTIER (13) sobre el posible efecto tóxico de los frutos de esta especie. El principio se encuentra en muy pequeña proporción en el fruto fresco y es termoestable, como lo confirma el hecho de haber cocido los frutos frescos sin pérdida de su acción tóxica. El análisis elemental demuestra que se trata de un producto a base de C, H y O, sin participación de azufre o nitrógeno. Aparentemente no se trata de un glicósido, ya que las reacciones hidrolíticas resultaron negativas.

De acuerdo con la bibliografía consultada, esta es la primera vez que se comunica el efecto tóxico de una ericácea.

Se comprueba, además, que los frutos de *Vaccinium consanguineum* Klotz. y *Myrtus oerstedii* (Berg) Hemsl. son inocuos. El aislamiento del prin-

cipio abre posibilidades para estudios posteriores en diferentes campos.

Las técnicas cromatográficas parecen confirmar la pureza del principio aislado.

RESUMEN

Se hace el estudio toxicológico comparativo de los frutos de tres "arrayanes" de las zonas altas de Costa Rica: *Pernettia coriacea* Klotz., *Vaccinium consanguineum* Klotz. y *Myrtus oerstedii* (Berg) Hemsl., comprobándose, por experimentos en animales de laboratorio, que únicamente poseen acción tóxica los frutos de *P. coriacea*.

Se describe el método para aislar el principio activo o tóxico de los frutos de *P. coriacea* al que se denomina tentativamente pernetina. Se determinan algunas propiedades físicas y químicas del principio.

SUMMARY

On the summits and high slopes of the mountains of Costa Rica grow several species of shrubby heath-like plants, collectively known as "arrayán". Toxicological study of the fruit of three of the most characteristic species is reported. Those of *Vaccinium consanguineum* Klotz. and *Myrtus oerstedii* (Berg) Hemsl. were found to be innocuous. Those of *Pernettia coriacea* Klotz. were found to be toxic. The toxic principle was isolated and tentatively named pernettine. Some physical and chemical characteristics of the substance are reported.

BIBLIOGRAFIA

1. BAILEY, L. H.
1950. *The Standard Cyclopedia of Horticulture*. Vol. 3 - P-Z: 3639 pp. + 2694-4056 figs., The MacMillan Company, New York.
2. BLOCK, R. J., et al.
1958. *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. 2 ed., xi + 710 pp., Academic Press Inc. New York.
3. GOLA, G., G. NEGRI Y C. CAPPELLETTI
1943. *Tratado de Botánica*. xxix + 1030 pp. + 735 figs., Editorial Labor S. A. Barcelona, España.
4. GUZMÁN, D. J.
1950. *Especies Útiles de la Flora Salvadoreña*. lxxx + 691 pp., Imprenta Nacional, San Salvador, El Salvador.
5. LEDERER, E. & M. LEDERER
1957. *Chromatography*. 2 ed., xx + 711 pp., Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
6. McELVAIN, S. M.
1953. *La caracterización de compuestos orgánicos. Análisis orgánico funcional*. xvi + 267 pp. Aguilar S. A., Madrid.

7. MURILLO, A.
1889. *Plantas Medicinales du Chili*. x + 234 pp. Lagny, Francia. Exposition Universelle de Paris.
8. PÉREZ CABRERA, R.
1938. *Sinopsis de Medicina Vegetal*. 434 pp. Imprenta Borrásé, San José, Costa Rica.
9. PITTIER, H.
1957. *Ensayo sobre plantas usuales de Costa Rica*. 2 ed., 264 pp. + 49 figs., Editorial Universitaria, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.
10. ROJAS, U.
1936. *Elementos de Botánica General*. Vol. 3: 1661 pp. Tipografía Nacional, Guatemala.
11. SÁENZ, J. A.
1964. Contribución al estudio fitoquímico de plantas costarricenses. I. Análisis Alcaloidal. *Rev. Biol. Trop.*, 12: 157-165.
12. SÁENZ, J. A. & M. NASSAR
1965. Phytochemical Screening of Costa Rican Plants. Alkaloid Analysis II. *Rev. Biol. Trop.*, 13: 207-212.
13. STANDLEY, P. C.
1937-38. Flora of Costa Rica. *Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser.*, Chicago 18 (1-4): 1-1616.
14. WEITSTEIN, R.
1944. *Tratado de Botánica Sistemática*. xix + 1039 pp. + 709 figs., Editorial Labor S. A., Barcelona, España.