

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA Y  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA.  
UNIVERSIDAD DE GRANADA.

“ESTUDIO DEL EFECTO RELAJANTE DE LA FIBRA LISA, EN  
UTERO AISLADO DE RATA, INDUCIDO POR DERIVADOS  
TERPENICOS CON Y SIN OXIGENO”.

Guerra Hernández, E.J. , García-Villanova, R. y Puche Cañas, E.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de dos series de terpenos, oxigenados (linalol) y no oxigenados (alfa-pineno, sabineno y limoneno) componentes mayoritarios estos últimos del aceite esencial del *J. sabina* L., tras comprobación cromatográfica, sobre la contracción del útero aislado de rata inducida por oxitocina ( $10^{-10}$  -  $10^{-9}$ M). Los resultados obtenidos indican la presencia de un antagonismo no competitivo entre dichos fármacos y la oxitocina a partir de concentraciones de  $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. El empleo de un emulgente como fue la sal sódica del ácido cólico con la intención de mejorar la dispersión en agua de los terpenos no mejoró los resultados obtenidos tras homogeneización de los mismos cuando estaban en disolución acuosa.

Palabras clave: Terpenos, Fibra lisa, Utero y Oxitocina.

SUMMARY

A study on the relaxing effect of some terpenic derivates, with oxygen (linalool) and without oxygen (alfa-pinene, sabinene and limonene), major components from essential oil of *J. sabina* L., over smooth muscle has been performed. Contraction rat isolated uterus was induced by increasing doses of oxytocin ( $10^{-10}$  -  $10^{-9}$ M). The results obtaines showed that terpenes ( $2,5 \cdot 10^{-4}$ M) have relaxing activity of uterus “in vitro” (non competitive antagonism with oxytocin dose depent). The use of emulsifier (sodium cholate) for help to solubility of terpenes in the water don't modify the results obtaines when the terpenes have been homogeneity in the water for agitation.

Key words: Terpenes, Smooth muscle, Uterus and Oxytocin.

## INTRODUCCION

Los aceites esenciales son "productos volátiles" aromáticos muy repartidos en el reino vegetal constituidos por mezclas de una o varias sustancias que dominan por su masa o la intensidad de su perfume, con otros compuestos presentes en menor cantidad y/o menos aromáticos.

Los compuestos químicos presentes en los aceites esenciales pueden clasificarse siguiendo a HEATH (1) en:

- a) Hidrocarburos terpénicos (sabineno, alfa-pineno).
- b) Derivados oxigenados de los terpenos (linalol, borneol, etc.).
- c) Compuestos aromáticos de estructura benzoica (vainillina, safrol, etc.).
- d) Compuestos que contienen nitrógeno y azufre (indol, dimetilsulfuro).

En el género *Juniperus*, los hidrocarburos terpénicos y los hidrocarburos terpénicos oxigenados son los que componen mayoritariamente el aceite esencial procedente de dicha especie botánica.

Entre las propiedades farmacológicas atribuibles a este aceite esencial se describen entre otras, su poder abortivo (2). Estudios experimentales al respecto describen la capacidad abortiva de los extractos de *J. sabina* L. en distintas especies animales (3-8); encontrando que el aceite esencial de *J. sabina* L. es capaz de inducir la contracción uterina "in vivo" (9) e "in vitro" al aplicarlo directamente sobre el útero de coneja (10-13). Todos estos estudios tienen en común el empleo de extractos alcohólicos y/o acuosos de frutos de *Juniperus* (sobre todo de *J. sabina* L.) no empleándose en ningún caso los principios activos puros, como es el caso de los terpenos, presentes de forma importante en dicho aceite esencial.

En este trabajo experimental presentamos los resultados de un estudio "in vitro" de la actividad del: sabineno, alfa-pineno, limoneno (sin oxígeno) y linalol (con oxígeno) componentes mayoritarios los tres primeros, previo estudio cromatográfico, del aceite esencial de *J. sabina* L. procedente de Sierra Nevada (Granada), sobre la contracción del útero aislado de rata inducida con dosis crecientes y acumulativas de oxitocina.

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Material y Métodos.*

#### 1.- Técnica del útero aislado de rata.

Se usaron ratas hembras de la cepa Wistar, con un peso comprendido entre 200-300 g, a las que previamente se estrogenizaron con dietilestilbestrol (5 mg/Kg i.p.) 48 horas antes del experimento. Previa muerte y sangrado del animal se extrajeron ambos cuernos uterinos, de 2 a 3 centímetros de longitud y uno de ellos se sumergió en una copa de perfusión con líquido de Jalón a 30°C, donde burbujeaba gas carbónico (95 % O<sub>2</sub> + 5 % de CO<sub>2</sub>). Posterior-

mente se fijó el útero a un transductor de presión fuerza con una tensión comprendida entre 1 - 1,5 g. y se esperaron 30 minutos antes de comenzar la experiencia, recambiando el líquido de Jalón cada 15 minutos. El segundo cuello uterino se dejó en líquido de Jalón con carbógeno a 30°C y se empleó una vez acabada la experiencia con el primero.

## 2.- Curva dosis-respuesta con oxitocina.

Tras 30 minutos y una vez estabilizado el modelo experimental, el útero fue sometido a una contracción, inducida por dosis crecientes y acumulativas de oxitocina a concentraciones comprendidas entre  $1,9 \cdot 10^{-10}M$  y  $9,8 \cdot 10^{-8}M$  en ausencia y presencia de las diferentes concentraciones de terpenos (desde  $10^{-6}$ - $10^{-2}M$ ).

La contracción del útero fue registrada mediante un transductor de presión fuerza Letica conectado a un polígrafo Letica mod. Unigraph 1000-100 Iso, con velocidad de papel constante.

Teniendo en cuenta que los terpenos empleados (sabineno, alfa-pineno, limoneno y linalol) son escasamente solubles en agua, partimos de una suspensión madre de  $10^{-2}M$ , la cual fue homogeneizada convenientemente (agitación), antes de ir añadiéndola en cada serie al vaso de perfusión, hasta obtener concentraciones aproximadas entre  $10^{-6}M$  a  $10^{-3}M$  en la copa de órganos.

Para confirmar que los terpenos empleados estaban en la copa de perfusión a la concentración deseada, se realizó un estudio comparativo utilizando un emulgente fisiológico como es la sal sódica del ácido cólico, con lo que se trataba de obtener una disolución más perfecta de estos componentes en dicha copa.

En primer lugar fue fijada la concentración necesaria de este emulgente para obtener una suspensión homogénea de terpenos, encontrándose que para la disolución madre de éstos ( $10^{-2}M$ ), se necesitaban  $3,5 \cdot 10^{-3}M$  de sal biliar, hecho que se comprobó comparando la respuesta de terpenos cuando estaban disueltos completamente en éter etílico o simplemente homogeneizados con sal biliar por medio de la cromatografía de gases sobre una columna Carbowax 1500. Posteriormente, se tomaron diferentes cantidades y se llevaron a la copa de perfusión comprobando que la respuesta cromatográfica de los mismos era la deseada teniendo en cuenta la concentración presente en la misma.

Por último, realizamos la comprobación de la existencia de posibles diferencias en la respuesta del útero a las dosis crecientes de oxitocina en ausencia y presencia de terpenos cuando estos previamente se homogeneizaban en agua destilada (por agitación) o con ácido cólico (sal sódica).

Los fármacos empleados se añadieron 5 minutos antes de comenzar la experiencia, partiendo de una suspensión homogénea de terpenos en la copa de perfusión hasta lograr la concentración molar aproximada que deseábamos.

## *Método estadístico.*

El cálculo de las diferencias entre los resultados obtenidos para cada serie de fármacos ensayados con respecto a su control de oxitocina se realizó me-

dante la aplicación del test de Student para muestras apareadas. Se consideraron estadísticamente significativas estas diferencias a partir de  $p \leq 0,05$ .

El tipo de antagonismo observado ( $pD'_2$ ) fue calculado según el método de ARUNLAKSHANA y SCHILD (14). Igualmente se hizo para las series de sal biliar.

#### *Fármacos empleados.*

alfa-pineno, limoneno, sabineno y linalol (DGF)

Dietiletilbestrol (Funk).

Sal sódica del ácido cólico (Merck).

Oxitocina (Sandoz).

## RESULTADOS

### 1) Resultados obtenidos con el sabineno tras agitación.

Conforme fuimos incrementando la concentración de sabineno en el vaso de perfusión, la curva dosis-respuesta de oxitocina fue aplanándose de forma progresiva, existiendo por tanto una relación dosis-respuesta al fármaco. Las diferencias observadas entre los controles y sus respectivas series de sabineno a las concentraciones de  $10^{-4}$ - $10^{-2}$ M respectivamente, fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ ) careciendo de efecto las series de  $10^{-6}$ M y  $10^{-5}$ M (fig. 1).

### 2) Resultados obtenidos con el alfa-pineno tras agitación.

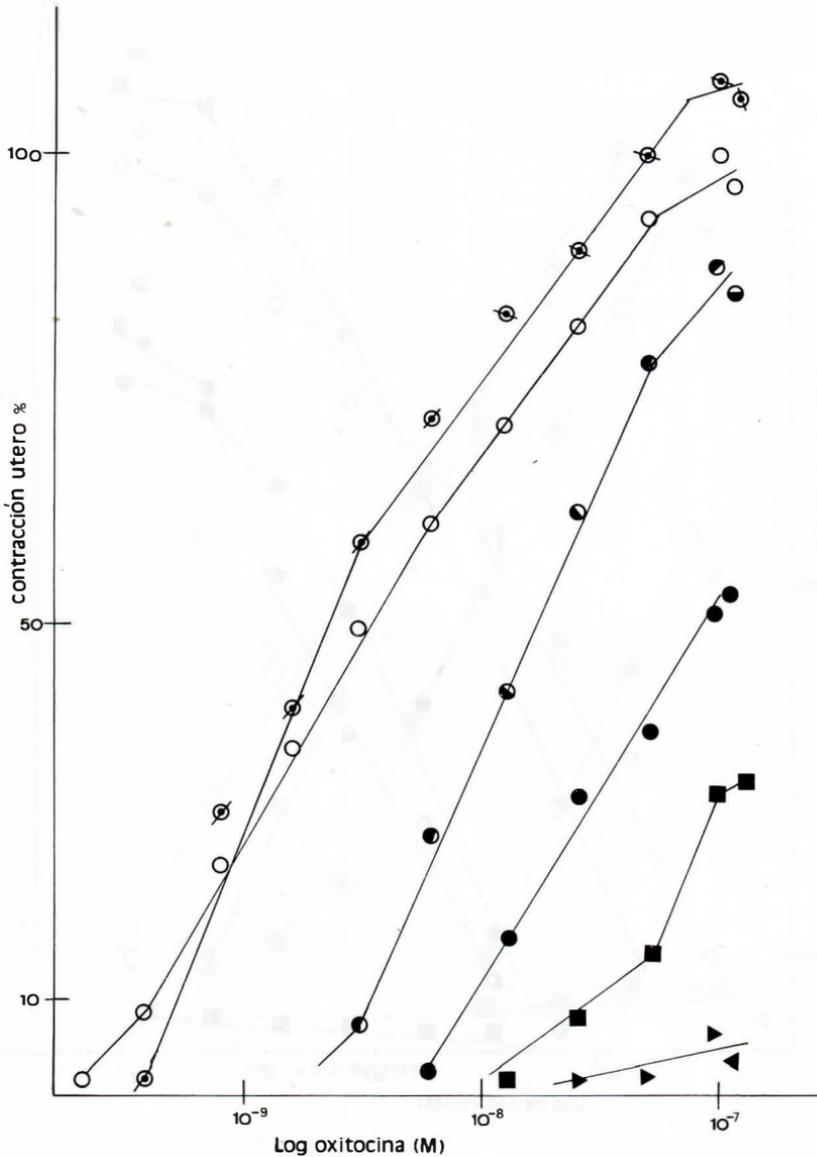
Las concentraciones ensayadas estaban comprendidas entre  $10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-3}$ M y al igual que el sabineno, conforme fuimos incrementando la concentración de alfa-pineno a partir de aproximadamente  $5 \cdot 10^{-4}$ M, en el vaso de perfusión, la curva dosis-respuesta de oxitocina en útero aislado de rata fue aplanándose progresivamente de  $0,05$ ) y desviándose hacia la derecha gradualmente (fig. 2).

### 3) Resultados obtenidos con el linalol tras agitación.

Las concentraciones ensayadas estaban entre  $10^{-7}$ - $10^{-3}$ M. El incremento de la concentración de linalol en el vaso de perfusión fue aplanando la respuesta contráctil de la oxitocina de una forma progresiva (fig. 3) siendo significativa a partir de  $2,5 \cdot 10^{-4}$ M ( $p < 0,05$ ).

### 4) Resultados obtenidos con el limoneno tras agitación.

El limoneno fue añadido a la copa de perfusión a concentraciones comprendidas entre  $10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-4}$ M. Las diferencias entre las curvas dosis-respuesta de oxitocina sola y en presencia de limoneno fueron estadísticamente significativas a partir de la concentración de  $10^{-4}$ M ( $p < 0,05$ ) observándose un progresivo aplanamiento de la curva dosis-respuesta de la oxitocina hacia la derecha (fig. 4).



**Figura 1.-** Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por oxitocina sola (○-○) y en presencia de sabineno  $10^{-4}$  M (◕-◕)  $5 \cdot 10^{-4}$  M (◑-◑),  $10^{-3}$  M (◐-◐),  $5 \cdot 10^{-3}$  M (■-■) y  $10^{-2}$  M (▲-▲), respectivamente sobre la contracción del útero aislado de rata previamente estroge-neizado. En abscisas representamos log de la concentración molar de oxitocina y en ordenadas la respuesta contráctil del útero expresado en %.

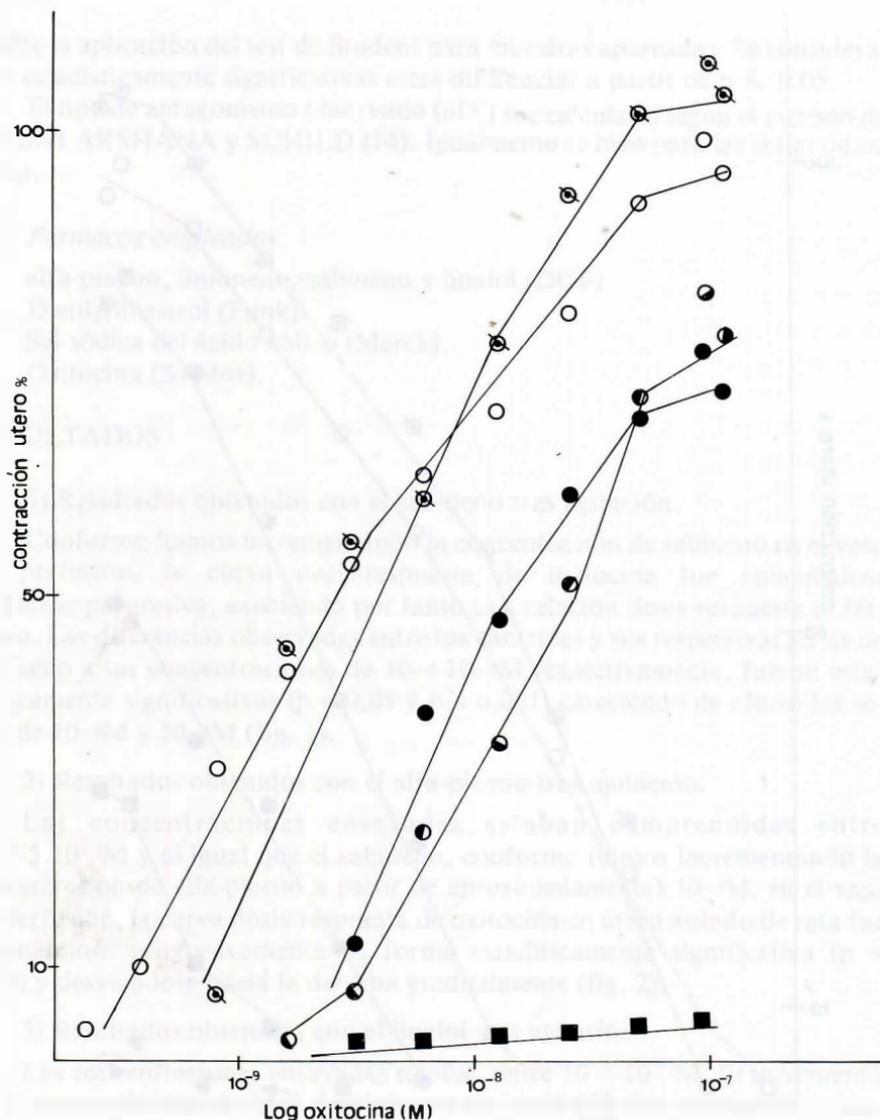
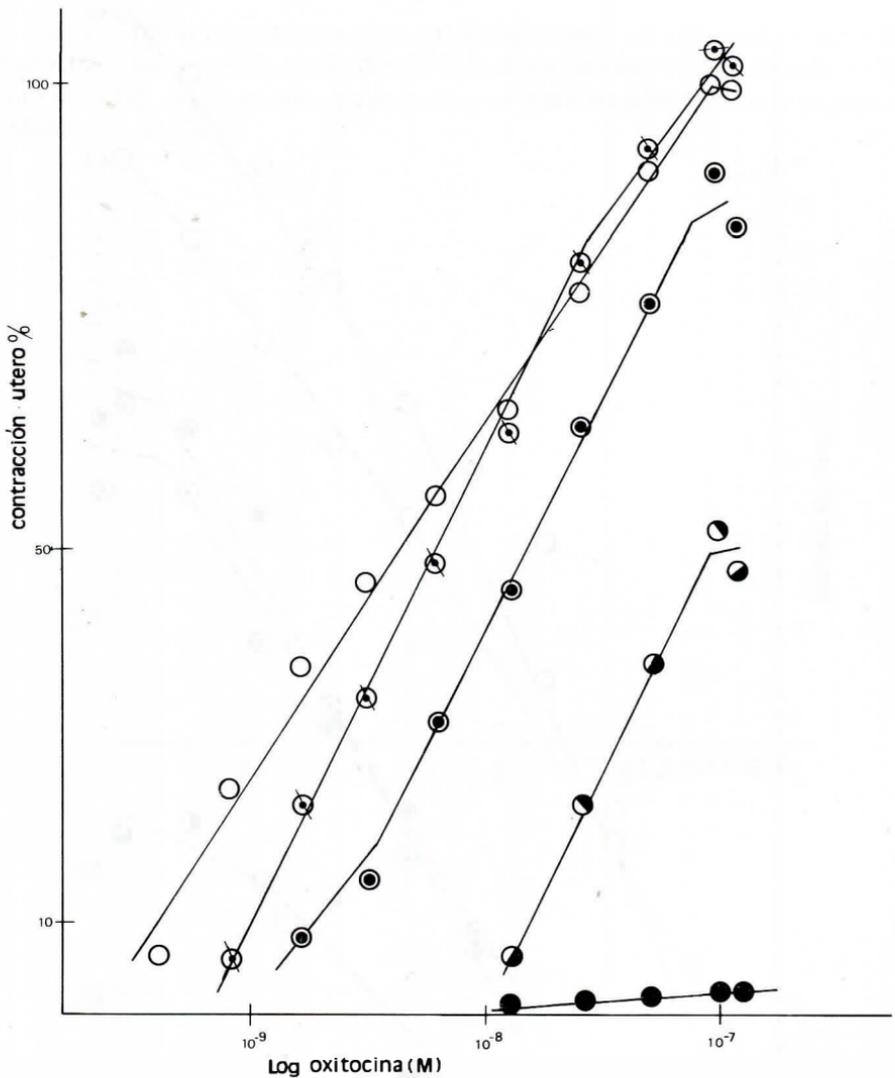


Figura 2.- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por oxitocina sola ( $\circ-\circ$ ) y en presencia de  $\alpha$ -pineno  $10^{-4}$  M ( $\circ/\circ$ ),  $5.10^{-4}$  M ( $\circ\bullet$ ),  $10^{-3}$  M ( $\bullet\bullet$ ) y  $5.10^{-3}$  M ( $\blacksquare-\blacksquare$ ) respectivamente sobre la contracción del útero aislado de rata previamente estrogeneizado. En abscisas representamos log de la concentración molar de oxitocina y en ordenadas la respuesta contráctil del útero, expresada en %.



**Figura 3.-** Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por oxitocina sola (○-○) y en presencia del linalol  $10^{-4}$  M (◐-◐),  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M (◑-◑),  $5 \cdot 10^{-4}$  M (◒-◒) y  $10^{-3}$  M (◓-◓) respectivamente sobre la contracción del útero aislado de rata previamente estrogeneizado. En abscisas representamos log de la concentración molar de oxitocina y en ordenadas la respuesta contráctil del útero, expresada en %.

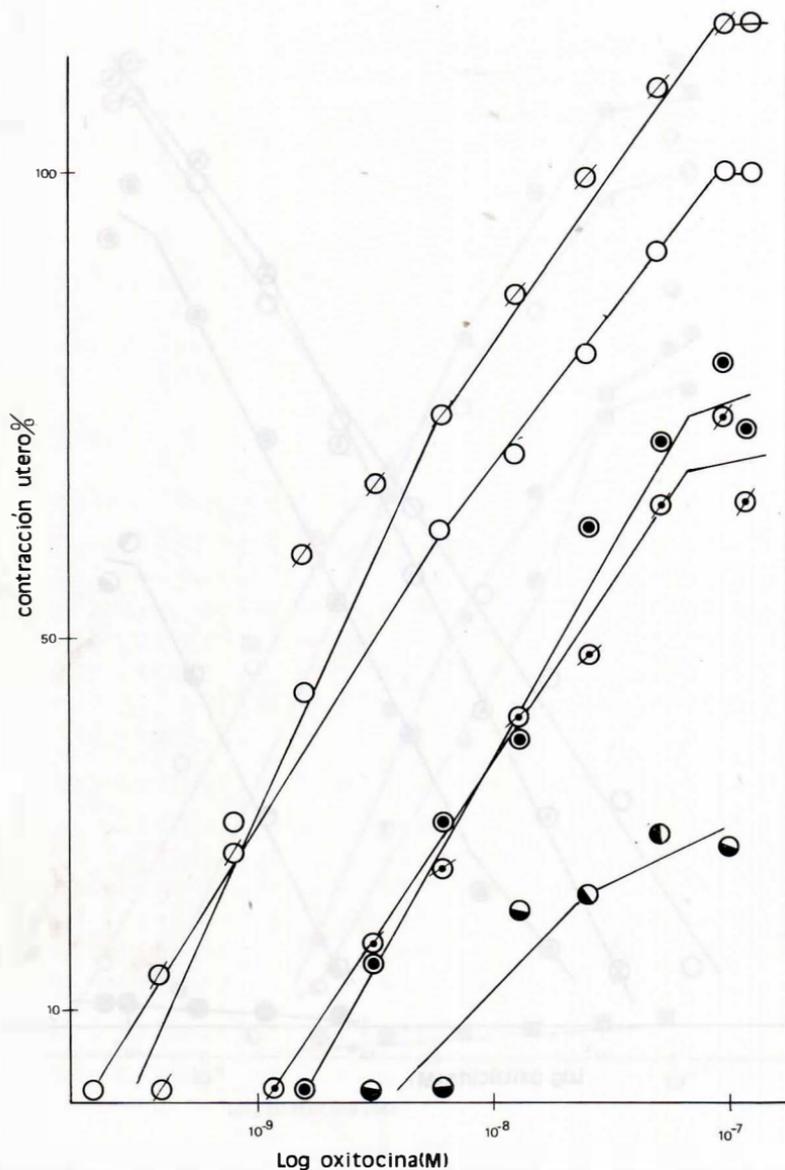


Figura 4.- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por oxitocina sola (○-○) y en presencia de limoneno  $10^{-5}$  M (○-○),  $10^{-4}$  M (○-○),  $2.5 \cdot 10^{-4}$  M (○-○) y  $5 \cdot 10^{-4}$  M (○-○) respectivamente sobre la contracción del útero aislado de rata previamente estrogeneizado. En abscisas representamos log de la concentración molar de oxitocina y en ordenadas la respuesta contráctil del útero, expresada en %.

Como los resultados sugerían un antagonismo no competitivo entre la oxitocina y los terpenos, dependiente de la dosis, se cuantificó mediante el cálculo del  $pD'_2$ , según el método descrito por ARUNLAKSHANA y SCHILD (14) (fig. 5, Tabla I).

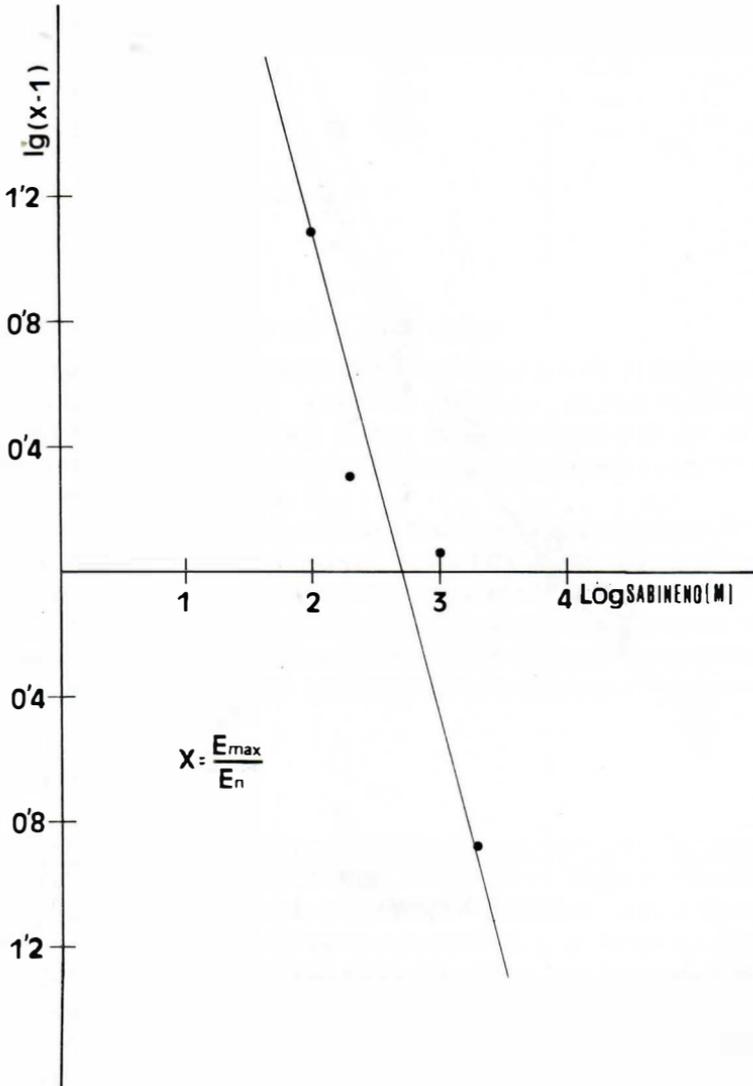


Fig. 5.- Representación gráfica para el cálculo del  $pD'_2$  correspondiente al efecto del sabineno en útero.

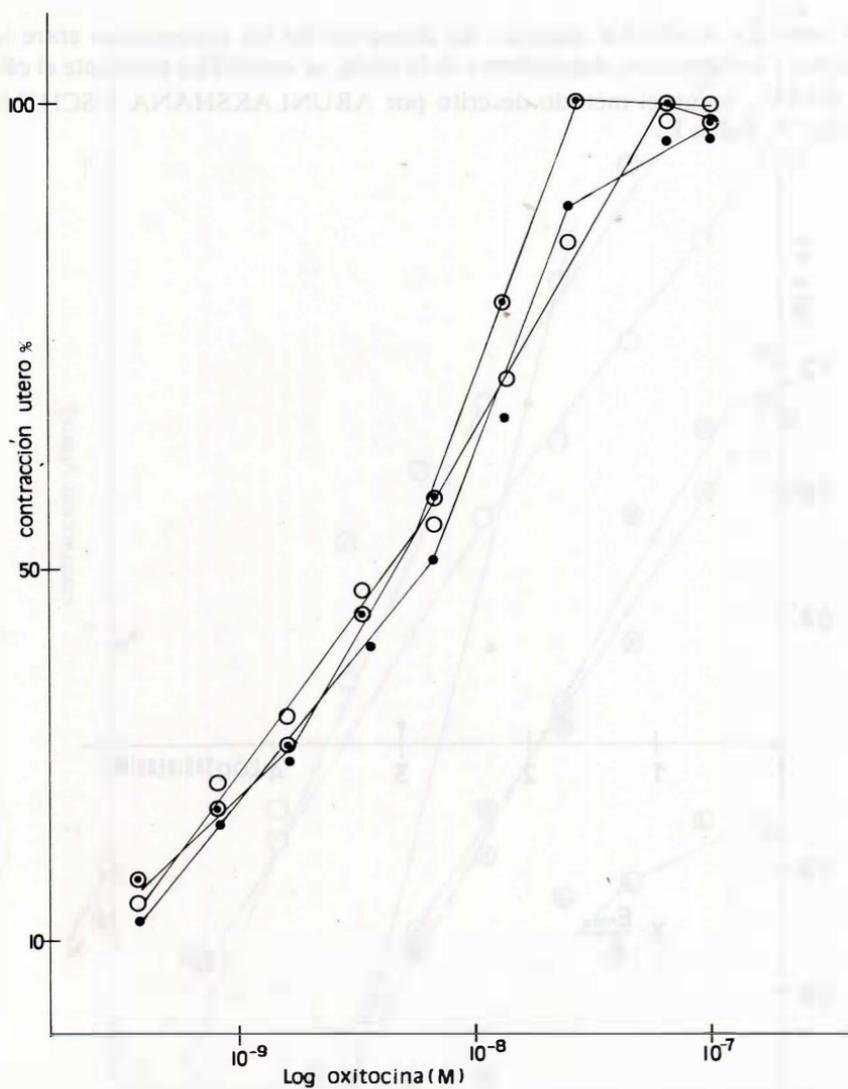


Figura 6.- Representación gráfica de los valores correspondientes a los efectos inducidos por oxitocina sola (○—○) y en presencia de ácido cítrico (sal sódica)  $3,5 \cdot 10^{-6}$  M (⊙—⊙) y  $3,5 \cdot 10^{-4}$  M (●—●) respectivamente sobre la contracción del útero aislado de rata previamente estrogeneizado. En abscisas representamos log de la concentración molar de oxitocina y en ordenadas la respuesta contráctil del útero expresada en %.

Tabla I.- Relación de los  $pD'_2$  (antagonismo no competitivo) de los diferentes terpenos estudiados.

Fármaco	$pD'_2(1)$	$pD'_2(2)$
Linalol	3,30	3,35
alfa-pineno	2,94	2,95
Sabineno	2,74	—
Limoneno	1,94	—

(1) Homogeneización mecánica.

(2) Emulsión con sal biliar.

### 5) Resultados obtenidos con el ácido cólico.

Los resultados obtenidos con el ácido cólico (sal sódica) cuyas concentraciones en la copa de órganos estaban comprendidas entre  $3,5 \cdot 10^{-6}M$ - $3,5 \cdot 10^{-4}M$  (partiendo de una disolución madre de  $3,5 \cdot 10^{-3}M$ ) no presentaron ninguna diferencia estadísticamente significativa con respecto a la curva patrón de oxitocina (fig. 6).

Los resultados obtenidos en la contracción del útero aislado de rata con oxitocina en presencia de los terpenos: alfa-pineno (no oxigenado) y linalol (oxigenado) empleados a las concentraciones anteriormente reseñadas ( $10^{-5}$ - $10^{-3}M$ ), no presentaron diferencias estadísticamente significativas ni para el alfa-pineno ni para el linalol frente a la serie donde se aplicaron en la copa de perfusión en solución acuosa previamente homogeneizada (mediante agitación).

## DISCUSION

Nuestros resultados indican que todos los terpenos estudiados tanto con oxígeno (linalol) como sin él (sabineno, alfa-pineno y limoneno) producen una inhibición dosis-dependiente de la contracción del útero aislado de rata inducida por dosis crecientes de oxitocina a partir de  $2,5 \cdot 10^{-4}M$  para el limoneno y linalol y  $5 \cdot 10^{-4}M$  para el sabineno y alfa-pineno respectivamente, presentando una mayor actividad el linalol seguido del alfa-pineno (Tabla I).

A pesar de que estos dos últimos terpenos mostraron una mayor actividad relajante de la fibra uterina, la verdad es que no existieron marcadas diferencias entre todos los terpenos ensayados pues presentaban una  $DE_{50}$  comprendida entre  $5 \cdot 10^{-4}M$  y  $5 \cdot 10^{-3}M$  e incluso un  $pD'_2$  muy bajo dado que son eficaces a concentraciones elevadas de los mismos  $5 \cdot 10^{-3}M$ .

El mecanismo de acción a través del cual nos explicamos su efecto relajante es a través de un antagonismo no competitivo frente a la oxitocina y por

tanto no mediado por receptores; sugiriendo una actuación a través de los intercambios iónicos transmembrana que tienen lugar en la fibra lisa muscular durante los procesos de contracción-relajación de los mismos y concretamente frente al calcio, como ya se ha descrito para el timol (15, 16) y terpinen-4-ol (17).

De otra parte merece comentar que el empleo de suspensiones acuosas de terpenos (sustancias con escasa hidrosolubilidad) en lugar de disoluciones verdaderas de los mismos en la copa de perfusión nos puede hacer pensar de entrada que sólo una fracción de dicho fármaco se solubilizaría de manera constante en el líquido de perfusión y por tanto obtendríamos un efecto parcial de los mismos sobre el modelo experimental en cuestión. Sin embargo, según nuestros resultados observamos por una parte una perfecta relación concentración-respuesta al añadir dosis crecientes de terpenos (en disolución acuosa tras agitación) y por otro lado que el empleo de un agente emulgente fisiológico como el caso del ácido cólico (sal sódica) que favorece la dispersión de dichos compuestos en agua como se comprobó cromatográficamente tampoco mejoró los resultados obtenidos frente a la aplicación directa de los terpenos en disolución acuosa; todo ello nos inclina a pensar en la existencia de un fenómeno directo causa-efecto de los terpenos sobre la fibra muscular uterina. Por tanto creemos que no es indispensable el empleo de un emulgente o un disolvente para intentar mejorar los resultados en nuestro modelo experimental, ya que la adición de un disolvente como el alcohol etílico tiene ya de por sí efectos marcados sobre la contracción muscular (18).

Por último, el que otros autores hayan descrito un efecto estimulante de la contracción uterina por parte de los aceites esenciales del *Juniperus*, nos hace pensar en dos cosas: primera, en que las dosis de terpenos son más elevadas que las empleadas por nosotros; segunda, que al aplicar directamente en cavidad uterina los extractos de *Juniperus* cabe la posibilidad de la existencia de otras sustancias distintas a los propios terpenos y por tanto con efectos también diferentes que actuarían a través de un efecto irritante de las mucosas y de la propia musculatura uterina.

#### BIBLIOGRAFIA

- ( 1 ) HEATH, H.B. "Source book of flavors". Ed. Publishing company, inc. Westport, Connecticut, p. 81.
- ( 2 ) AGRAWAL, O.P., SANTOSH, B., MATHUR, R. *Plan. Med. supp.* 98-101, (1980).
- ( 3 ) KAGAYA, M. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 124, 245 (1927), citado por: BENIGNI, R., CAPRA, C. Y CATTORINI, P.E. "Pianta medicinale chimica, farmacologia e terapie II". Ed. Ivernini and della Beffa. Milano, 1962, p. 1288-1389.
- ( 4 ) EICHHOLTZ, F. "Tratado de Farmacología". Ed. Aguilar. Madrid. 1963. p. 156-157.
- ( 5 ) CASARES, R. *Food Cosmet. Toxicol.*, 2, 680-682. (1964).
- ( 6 ) BRONDEGARRD, V.J. *Sudhoff Arch. Gesch. Med.*, 48, 331-351. (1964).
- ( 7 ) SAN MARTIN CASAMADA, R. "Farmacognosia y Farmacodinamia". Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1968, p. 484.

- ( 8) CANALE, M. *Minerva Ginecol.*, 21(18), 1183-1185 (1969).
- ( 9) ROHRIG, J. *Journal Pharm. Belg.* (1923), citado por: BENIGNI y cols.
- (10) FOSCHI, M. *La Clin. Veterinaria*, 61, 474 (1938).
- (11) PAUCHET, L.M. "Medicine-officiale et Medicine naturelle", 1.<sup>a</sup> Ed. Ed. A. Basticla. Chauny, 1940.
- (12) RENAUX, J. *Journ. Pharm. Belg.* 1943, citado por FONQUER, P. "Plantas medicinales. El Discórides renovado". 7.<sup>a</sup> ed. Ed. Labor, Barcelona 1981, p. 86-87.
- (13) PARIS, R.R. y MOYSE, H. "Precis de Matiere Medicale". Ed. Masson y Cie. Paris, 1965, 364-489.
- (14) ARUNLAKSHANA, O. y SCHILD, H.O. *Brit J. Pharmacol.*, 14, 45-58 (1959).
- (15) ITO, Y. y KURIYAMA, H. *J. Physiol.*, 23, 455-470. (1973).
- (16) ITO, Y., OSA, T. y KURIYAMA, H. *J. Physiol.*, 24, 343-357. (1974).
- (17) LOPEZ G.<sup>a</sup> DE LA SERRANA, H., GARCIA VILLANOVA, R. y PUCHE CAÑAS, E. *Ars Pharm.*, 26(1), 39-47 (1985).
- (18) LOPEZ G.<sup>a</sup> DE LA SERRANA, H., GARCIA VILLANOVA, R y PUCHE CAÑAS, E. *Ars Pharm.* 26(4), 277-282 (1985).