

Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de Peces Cebra

Antiinflammatory effect of methanolic plant extracts from Azuay and Loja (Ecuador) in the Zebrafish model

Eugenia Peñaherrera¹, Lourdes Jerves-Andrade¹, Nancy Cuzco¹, Isabel Wilches¹, Fabián León-Tamariz¹, and Vladimiro Tobar²

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, eugenia.penaherrera@ucuenca.edu.ec

² Facultad de Ingeniería, Universidad de Cuenca

Recibido: 01-03-2016. Aceptado: 30-03-2016

Resumen. Los peces cebra son utilizados como modelo biológico para *screening* primario de extractos de plantas con potencial bioactividad, aprovechando sus similitudes: genética, fisiológica y respuesta farmacológica con los mamíferos. En el estudio se empleó este modelo para valorar la actividad antiinflamatoria de 36 extractos metanólicos de plantas medicinales utilizadas en las provincias de Azuay y Loja (Ecuador). Parte del material vegetal fue recolectado con el aporte de una hierbatera de etnia Saraguro. Los extractos fueron preparados por percolación y su toxicidad fue evaluada en peces cebra en concentraciones variables de 400 a 3,125 $\mu\text{g/ml}$, determinándose la máxima concentración tolerada para cada uno de éstos. La actividad antiinflamatoria se evaluó a través del ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido de *Salmonella typhi*. Los extractos de: *Cestrum aff. peruvianum*, *Galinsoga parviflora*, *Galium* sp., *Oenothera tetraptera*, *Peperomia aff. galioides*, *Passiflora ampullaceae* y *Ambrosia arborescens*, correspondientes al 18,92% de los analizados, mostraron un potencial antiinflamatorio comparable con indometacina y dexametasona; siendo el extracto metanólico de *Cestrum aff. peruvianum* el más relevante a 50 $\mu\text{g/ml}$. El análisis fitoquímico básico de los extractos se realizó por cromatografía de capa fina, evidenciándose la presencia de saponinas y terpenoides como compuestos principales en la mayoría de los extractos.

Palabras claves. actividad antiinflamatoria, inflamación, peces cebra, plantas medicinales.

Abstract. The biological model of zebrafish has been widely used in primary screening of plant extracts for antiinflammatory effect, due to its genetic, physiological and pharmacological response similarities to mammals. The present study evaluated the antiinflammatory activity of 36 methanol extracts prepared from medicinal plants used by communities in the provinces of Azuay and Loja (Ecuador). The plant material was collected with the support of a Saraguro herbalist. The extracts were prepared by percolation and the toxicity was evaluated in zebrafish model at concentrations ranging from 400 to 3,125 $\mu\text{g/ml}$; determining the maximum tolerable concentration. The antiinflammatory activity was analyzed by using the leukocyte migration test induced by lipopolysaccharide of *Salmonella typhi*. Extracts of: *Cestrum aff. peruvianum*, *Galinsoga parviflora*, *Galium* sp., *Oenothera tetraptera*, *Peperomia aff. galioides*, *Passiflora ampullaceae* and *Ambrosia arborescens*, equivalent to 18,92% of the analyzed ones, have antiinflammatory potential comparable with the positive controls indomethacin and dexamethasone; being the methanol extract of *Cestrum aff. Peruvianum* (50 $\mu\text{g/ml}$), the most relevant. The phytochemical analysis of the extracts by Thin Layer Chromatography showed the presence of saponins and terpenoids as the principal components in most of the extracts.

Keywords. antiinflammatory activity, inflammation, medicinal plants, zebrafish.

1. Introducción

El estudio de principios activos provenientes de productos del reino vegetal requiere, entre otros, el empleo de modelos animales para la determinación de actividades farmacológicas [1]. El modelo de peces cebra (*Danio rerio*) es una herramienta importante en investigación biomédica por las ventajas que presenta el mismo: su similitud con mamíferos, la alta tasa de fecundidad, el pequeño tamaño y transparencia óptica de embriones y larvas y el rápido desarrollo extrauterino [2]. Estas características permiten realizar un gran número de ensayos empleando cantidades (microgramos) pequeñas de compuesto y visualizar los efectos sobre los órganos y tejidos internos de los animales. Se destacan tres áreas de particular aplicabilidad de este modelo en el descubrimiento primario de compuestos naturales: inmunidad e inflamación, epilepsia y cardiotoxicidad [3].

La inflamación es uno de los mecanismos a través de los cuales el organismo trata de mantener sus condiciones homeostáticas frente a amenazas de agentes externos como patógenos o lesiones, implicando fenómenos celulares, vasculares y mediadores derivados de los mismos. En este proceso, los macrófagos tisulares reconocen determinados patrones moleculares del agente patógeno o lesional y liberan citocinas como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral α (TFN- α) y varias quimiocinas. Las citocinas producen dilatación vascular, exudación de líquido y expresión de moléculas de adherencia; posteriormente, los leucocitos (principalmente neutrófilos) se adhieren y migran a través del endotelio vascular hacia el tejido lesionado o lugar en el que se encuentra el patógeno, produciéndose fagocitosis del mismo, apoptosis y resolución del proceso [4, 5].

La actividad antiinflamatoria de principios activos puede ser evaluada a través de modelos *in vitro* [6] e *in vivo*; siendo estos últimos más relevantes debido a la dinámica celular envuelta en el proceso [7]. El modelo de peces cebra ha sido validado para el estudio primario de la inflamación a través de la cuantificación de los granulocitos neutrófilos migrados al sitio de la lesión [3, 8, 9].

Por otro lado, Ecuador es considerado un país megadiverso por su riqueza biológica. Algunos compendios etnomédicos reportan más de 150 especies vegetales para tratar procesos inflamatorios de diversa índole como: dolores articulares, “inflamación de calor”, inflamación de los riñones, etc. Dentro de las plantas reportadas están: sauco negro, pacunga, shullo cápsula, congona amarga, gullán y altamisa, entre otras [10, 11]. Sin embargo, no se conocen estudios farmacológicos que valoren científicamente este potencial, razón por la cual el objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antiinflamatoria de 36 especies vegetales empleando el modelo de peces cebra, partiendo de la hipótesis de que algunas de las plantas reportadas en la literatura etnobotánica o empleadas en medicina tradicional presentan actividad antiinflamatoria que puede ser comprobada farmacológicamente.

2. Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para el ensayo de migración leucocitaria fueron empleados los siguientes reactivos de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA): etil 3-aminobenzoato metanosulfonato sal (tricaína), n-feniltiourea (PTU) (98 %), lipopolisacáridos de *Salmonella typhi* (LPS), formaldehído wt. 37 % en agua (grado histológico), solución salina de buffer de fosfatos (PBS), monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 20). El etanol absoluto para análisis y kit para detección de la reacción de la peroxidasa en leucocitos Leucognost®POX fue obtenido de Merck (Darmstadt, Germany). La Indometacina (Indocid®I.V. liofilizado 1 mg) proviene de Ovation Healthcare International Ltd. (Dublin, Irlanda) y la dexametasona (Decadrón, vial 8 mg/ml) de Tecnoquimicas S.A.(Cali, Colombia). El agua deionizada empleada para los ensayos fue obtenida en un equipo de ósmosis inversa BarnsteadTM RO (D12651, Thermo Scientific®), 2008) y el agua tipo II fue obtenida en un equipo Elix 3 Millipore Corporation, Francia. Las sustancias de referencia correspondientes a ácidos fenólicos, flavonoi-

des, cumarinas, taninos, alcaloides y terpenoides, fueron de Sigma-Aldrich Chemie GmbH, (Steinheim, Germany).

2.2 Métodos

2.2.1 Material vegetal

La selección de plantas con potencial antiinflamatorio estuvo basada, tanto en la información etnomédica reportada en “Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, Retos y Perspectivas” [10], y en la “Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador” [11], como en la proporcionada por Luisa Gualán (hierbatera de etnia Saraguro). Criterios complementarios de selección fueron: plantas empleadas por algunas comunidades de Azuay y Loja en procesos inflamatorios, abundancia de las especies, y ausencia de estudios farmacológicos previos sobre las mismas. Las plantas colectadas fueron sometidas a procesos de lavado, secado y almacenamiento hasta su análisis según los protocolos normalizados de trabajo del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales, basados en normativas internacionales y estudios locales [12, 13]. La identificación de cada planta se llevó a cabo en el Herbario de la Universidad del Azuay, lugar en el cual reposan los vouchers de cada una.

2.2.2 Extractos vegetales

Los extractos vegetales metanólicos se obtuvieron por el método de percolación [14, 15]. El solvente de los extractos se eliminó a presión reducida a través de un rota-vapor Laborata 4000 Heidolph Instruments®D-91126 (Schwabach, Germany) y corriente de nitrógeno (N₂). Posteriormente, se prepararon las muestras de extractos para liofilización mediante la disolución del material extraído en una solución de agua/metanol en proporción 80/20 v/v y congelamiento a 80 °C durante 6 horas. Las muestras así tratadas se liofilizaron (Labconco®Free Zone 2.5 64132, USA) durante 20 horas a -50 °C y a una presión de 0,080 mBar. Los extractos secos fueron almacenados a 4 °C hasta su análisis.

2.2.3 Animales de experimentación

Los peces cebra adultos de la línea AB fueron mantenidos a 28 +/- 2 °C en tanques con capacidad de 40 y 100 litros con una densidad poblacional de 25 peces/10 litros, con un ciclo luz/oscuridad de 14/10 horas según los protocolos normalizados de trabajo establecidos en el laboratorio de peces cebra del Proyecto VLIR de plantas medicinales, protocolos adaptados de los lineamientos estandarizados de mantenimiento de peces cebra en laboratorios de experimentación [16]. Los peces adultos fueron alimentados 3 veces al día con alimento seco (hojuelas Sera®) y alimento vivo (*Artemia salina*). La colección de los huevos se realizó en trampas plásticas dispuestas al fondo de cada tanque. Luego de la clasificación de los huevos embrionados, éstos se mantuvieron en medio de mantenimiento (Danieau's) durante 24 horas post-fertilización (hpf). Desde el día 1 hasta el 3 post-fertilización se adicionó una solución 2 mM de feniltiourea (PTU) en relación 1:10, PTU: medio embrionario.

2.2.4 Evaluación toxicológica en peces cebra

La evaluación toxicológica (alteraciones cardíacas, deformación de cola, alteración del eje antero-posterior y muerte) se realizó con la finalidad de determinar la concentración máxima tolerada (MTC) de cada extracto a ser evaluado en el ensayo antiinflamatorio. El rango de concentraciones probado fue de 400 a 3,125 µg/ml. Las larvas de peces cebra de 4 dpf se incubaron durante 8 horas a 28 °C, luego de lo cual al valorarlas, se estableció como MTC la concentración a la que no se observó los signos de toxicidad antes descritos en ninguna de las diez larvas probadas.

2.2.5 Ensayo de actividad antiinflamatoria en peces cebra

El ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido (LPS) en larvas de peces cebra de 4 dpf se realizó en base a los trabajos de [7, 17, 18]. Para el análisis se utilizaron placas de 24 pocillos con tapa (COSTAR, Corning Incorporated, USA). La concentración de extracto evaluada fue la MTC en el caso de las muestras, y 200 μM y 100 μM para los controles positivos que correspondieron a dexametasona e indometacina respectivamente. Se incubaron diez larvas por pocillo durante 1 hora a 28 °C: un pocillo con 1 ml de medio embrionario (control negativo), un pocillo con 1 ml de extracto (muestra) y un pocillo con 1 ml de la solución de los controles positivos. Tanto los controles como las muestras contenían 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO). Las larvas se anestesiaron usando una solución 15 mM de tricaina para proceder al corte de la cola con una hoja de bisturí No.23, luego se lavaron con medio embrionario y se añadió 1 ml de la solución de extracto o control positivo, según el caso, conteniendo 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS, y se incubaron por 7 horas más. Las larvas se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 %, se lavaron con buffer de fosfatos (0,1 % Tween20) y se tiñeron usando el reactivo Leucognost®Pox Merck [19]. Se realizaron tres repeticiones de cada experimento. Los leucocitos migrados se cuantificaron según la escala que se muestra en la Figura 1.




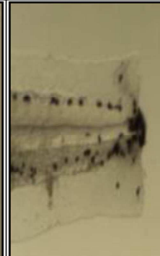
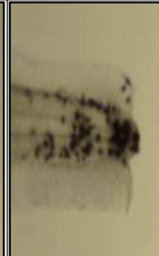
Leucocitos migrados	0 a 5	6 a 10	11 a 15	16 a 20	> 20
Escala	0	1	2	3	4
Representación visual de la escala					

Figura 1. Escala para cuantificación de leucocitos migrantes hacia el sitio de lesión.

2.2.6 Cromatografía de capa fina (TLC)

El análisis de la composición fitoquímica general de los extractos que mostraron actividad antiinflamatoria se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). Se emplearon placas de gel de sílice (10 x 5 cm; Merck, Darmstadt, Alemania) provistas de un indicador de fluorescencia (254 nm). Se prepararon tres fases móviles: a) acetato de etilo/metanol/agua (100/13,5/10); b) n-hexano/acetato de etilo (85/15) y c) n-propanol/ácido fórmico/agua (90/3/9). El corrimiento en placa incluyó los extractos a analizar y sustancias de referencia correspondientes a: compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, terpenoides, alcaloides, lignanos y taninos. Luego del corrimiento las placas fueron valoradas bajo radiación UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), y fueron reveladas con: una solución al 10 % de KOH en etanol para la determinación de cumarinas; cloruro férrico al 1 % en etanol para taninos; el reactivo PEG Productos- Naturales (difetilboril-oxietilamina 1 % en metanol absoluto y PEG 4000 5 % en etanol absoluto) para flavonoides y ácidos fenólicos; una solución de Dragendorff para detección de alcaloides; vainillina en ácido fosfórico para la evaluación de saponinas, lignanos y terpenoides; y, con una solución de anisaldehído en ácido sulfúrico para compuestos terpenoides, propilpropanoides y saponinas.

2.2.7 Análisis estadístico

En el diseño experimental del estudio las variables independientes fueron: día, muestra de extracto vegetal y concentración (MTC) expresada en $\mu\text{g}/\text{ml}$; y, la varia-

ble dependiente medida fue el indicador de migración leucocitaria. Para el análisis estadístico se consideró un diseño completamente aleatorizado de un factor, el cual fue realizado por medio del programa R [20]. La validación de la metodología se la realizó a través de la detección de diferencias entre las repeticiones del ensayo empleando un procedimiento ANOVA. Para el análisis de actividad de los extractos vegetales se empleó el procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey [21] entre las muestras y los controles positivo y negativo. En cada día de análisis se incluyeron controles (positivo y negativo) a fin de eliminar variaciones en el proceso así como las relacionadas con el comportamiento de las larvas. Para la comparación se empleó la librería de R “agricolae” que permite realizar las comparaciones múltiples con el test HSD Tukey con un nivel de confianza family-wise de 95 % y que como resultado agrupa los tratamientos similares. Adicionalmente, se estimó el porcentaje de migración leucocitaria escalado de 0 a 100, teniendo por 0 el valor promedio del indicador de migración leucocitaria de los controles positivos dexametasona (200 μM) e indometacina (100 μM); y siendo 100 el indicador de migración leucocitaria del control negativo (medio embrionario Danieus/DMSO 1 % v/v).

3. Resultados y discusión

3.1 Resultados

Se recolectaron 36 plantas, de las cuales 32 especies fueron nativas, 2 endémicas y 2 introducidas. Del total de plantas recolectadas, 30 se identificaron hasta especie y 6 hasta género. De las 20 familias botánicas a las que pertenecen dichas plantas, las más representativas fueron: *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Oenotheraceae* y *Piperaceae* (Tabla 1). Se obtuvieron 37 extractos metanólicos a partir de las 36 especies recolectadas; pues de *Peperomia aff. galioides* se prepararon 2, correspondientes a partes botánicas diferentes (tallo y parte aérea completa).

Como primer punto de análisis se consideró la validación del experimento por posibles diferencias entre repeticiones, rechazándolas con un valor p de 0,3014; implicando que no existen diferencias entre repeticiones del ensayo.

El ensayo antiinflamatorio de migración leucocitaria inducido por LPS se llevó a cabo con los extractos metanólicos de cada planta a concentraciones de MTC para cada uno de ellos. El análisis posterior de los datos permitió identificar 7 extractos con actividad equivalente a los controles positivos indometacina y dexametasona. El porcentaje de migración leucocitaria fue calculado de manera escalada: de 0 (para controles positivos: dexametasona 200 μM e indometacina 100 μM) a 100 (para el control negativo); resultados que se presentan en la Tabla 2.

De conformidad con el análisis realizado, el resultado más relevante corresponde al extracto metanólico de *Cestrum aff. peruvianum* Willd. ex Roem. & Schult. (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) cuyo potencial antiinflamatorio es comparable a los resultados obtenidos en este ensayo con indometacina y dexametasona. A nivel referencial, en la Figura 2, se incluye una ilustración de la migración leucocitaria obtenida.

A fin de complementar el estudio, se realizó una marcha fitoquímica de cada uno de los extractos farmacológicamente activos utilizando TLC. Los resultados se presentan en la Tabla 3, siendo las saponinas y terpenoides los principales grupos químicos presentes en los extractos activos.

3.2 Discusión

Los resultados expuestos anteriormente respaldan el conocimiento etnomédico reportado. De la Torre y col., mencionan que *Cestrum peruvianum* es utilizado por algunos grupos étnicos aborígenes y mestizos de la Sierra ecuatoriana para tratar procesos inflamatorios de amígdalas, fiebre, dolores articulares, reumatismo, hemorroides, resfriados, entre otros [11]. Otras especies del género *Cestrum* como: *Cestrum parqui*, extracto metanol:agua (1:1), evidenció actividad antiinflamatoria a través del ensayo de inhibición del edema plantar inducido por carragenina en roedores, y por la prueba de agregación plaquetaria inducida por adenosín difosfato (ADP) [22].

Tabla 1. Plantas colectadas en Azuay y Loja (Ecuador) con potencial actividad antiinflamatoria

Nombre común	Familia	Género	Especies	Parte usada	Origen
Aliso	BETULACEAE	<i>Alnus</i>	<i>acuminata</i> Kunth	H,F	N
Altamisa	ASTERACEAE	<i>Ambrosia</i>	<i>arborescens</i> Mill	H,F	N
Tilo ó sauco	CAPRIFOLIACEA	<i>Sambucus</i>	<i>mexicana</i> C. Presl ex DC.	H,F	N
Gullán	PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora</i>	<i>ampullacea</i> (Mast.) Harms	PA	E
Salvia real	LAMIACEAE	<i>Salvia</i>	<i>corrugata</i> Vahl	H,F	N
—	RUBIACEAE	<i>Galium</i>	sp.	PA	N
Gañal	PROTEACEAE	<i>Oreocallis</i>	<i>grandiflora</i> (Lam.) R.Br.	H,F,Fr	N
Chulchul	ELAEOCARPACEAE	<i>Vallea</i>	<i>stipularis</i> L.f.	N	
Virgenchilca	ASTERACEAE	<i>Ageratia</i>	sp.	H,F,T	N
Zapatito	CALCEOLARIACEAE	<i>Calceolaria</i>	sp.	PA	N
Congona	PIPERACEAE	<i>Peperomia</i>	<i>rotundata</i> Kunth	H,F	N
ñachag	ASTERACEAE	<i>Bidens</i>	<i>andicola</i> Kunth	H,F,T	N
Calaguuala	POLYPODIACEAE	<i>Niphidium</i>	<i>crassifolium</i> (L.) Lellinger	R	N
—	ASTERACEAE	<i>Baccharis</i>	<i>Caespitosa</i>	H,F,T	N
Karipoleo	LAMIACEAE	<i>Mintostachis</i>	sp.	PA	N
Congona amarga	PIPERACEAE	<i>Peperomia</i>	<i>aff.galioides</i> Kunth	PA	N
Congona amarga	PIPERACEAE	<i>Peperomia</i>	<i>aff.galioides</i> Kunth	T	N
Zhalshon	LAMIACEAE	<i>Lepechinia</i>	<i>heteromorfa</i> (Briq.) Epling	B	N
Duco	CLUSIACEAE	<i>Clusia</i>	<i>aff.elliptica</i> Kunth	H	N
Huarmihuabuel	MYRTACEAE	<i>Persea</i>	<i>brevipes</i> Meisn	B	E
Karihuahuel	MYRTACEAE	<i>Myrcianthes</i>	<i>rhopaloides</i> (Kunth) McVaugh	B	N
Piquimuro	ROSACEAE	<i>Margyricarpus</i>	<i>pinnatus</i> (Lam.) Kuntze	PA	N
Shullogrande	OENOTHERACEAE	<i>Oenothera</i>	<i>laciniata</i> Hill	TP	N
Shulloamarillo	OENOTHERACEAE	<i>Oenothera</i>	<i>multicaulis</i> Ruiz & Pav	TP	N
Shullocápsula	OENOTHERACEAE	<i>Oenothera</i>	<i>tetraptera</i> Cav.	C	N
Shullo rosado	OENOTHERACEAE	<i>Oenothera</i>	<i>rosea</i> L'Hér.ex Aiton	TP	N
Ataco	AMARANTACEAE	<i>Amaranthus</i>	<i>caudatus</i> L.	PA	N
Cañayuyo	ASTERACEAE	<i>Sonchus</i>	<i>oleraceus</i> L.	PA	I
San Antonio	FABACEAE	<i>Desmodium</i>	<i>molliculum</i> (Kunth) DC	TP	N
Sauco negro	SOLANACEAE	<i>Cestrum</i>	<i>peruvianum</i> Willd. ex Roem. & Schult.	PA	N
Cancer sacha	GERANIACEAE	<i>Geranium</i>	<i>chiloense</i> Wild ex Kunth	PA	N
Preñadilla	URTICACEAE	<i>Pilea</i>	sp.	TP	N
Pacunga	ASTERACEAE	<i>Galinsoga</i>	<i>parviflora</i> Cav.	PA	I
Mishki congona	PIPERACEAE	<i>Peperomia</i>	sp.	PA	N
Trigopichana	LAMIACEAE	<i>Clinopodium</i>	<i>mutabile</i> (Epling)Harley & Schult.	PA	N
Trinitaria	FABACEAE	<i>Otholobium</i>	<i>mexicanum</i> (L.f.) J.W.	PA	N
Laurel de cera	MYRICACEAE	<i>Myrica</i>	<i>parvifolia</i> Benth.	PA	N

H:hoja; B:brote; C:cápsula; F:flor; Fr:fruto; PA:parte aérea; R:rizoma; T:tallo; TP:toda la planta. E:endémica; I:introducta; N:nativa

Cestrum auriculatum y *Cestrum hediundinum* exhibieron su actividad antiinflamatoria mediante un ensayo *in vivo* de la inhibición de prostaglandinas E1-E2 [23]. En el presente estudio se ha demostrado la actividad antiinflamatoria de *Cestrum peruvianum* a través del ensayo *in vivo* de inhibición de la migración de leucocitos en peces cebras, corroborando su uso etnomédico en condiciones inflamatorias, semejante a lo reportado para las otras especies. El análisis cromatográfico de *Cestrum peruvianum* evidenció la presencia de cumarinas, terpenoides, saponinas y compues-

Tabla 2. Extractos metanólicos activos, según el ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido (LPS)

Nombre científico	MTC($\mu\text{g/ml}$)	%ML
<i>Ambrosia arborescens</i> Mill	100	21.20 %
<i>Passiflora ampullaceae</i> (Mast.) Harms	400	20.00 %
<i>Peperomia aff. galioides</i> Kunth ^a	6.25	17.30 %
<i>Oenothera tetraptera</i> Cav.	300	16.70 %
<i>Galium</i> sp.	300	15.20 %
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	400	13.30 %
<i>Cestrum aff. peruvianum</i> Willd. ex Roem. & Schult.	50	2.60 %

^a parte aérea

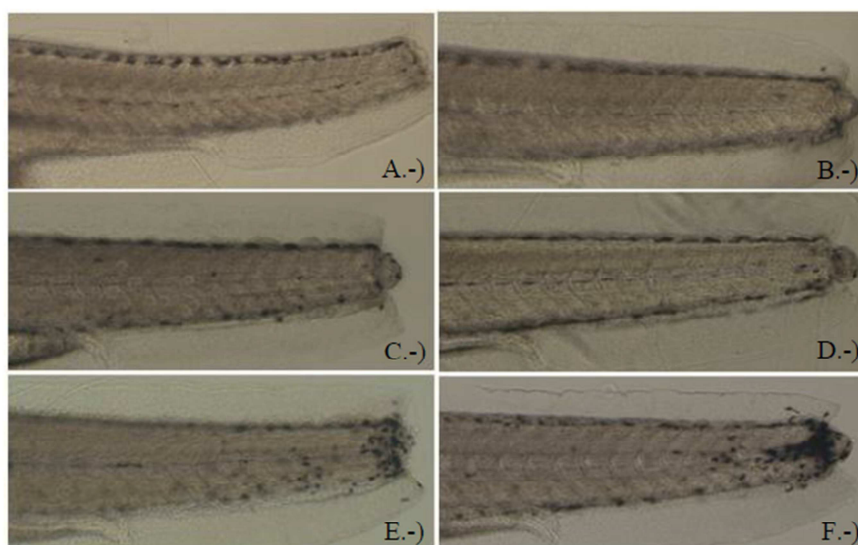


Figura 2. Ensayo de actividad antiinflamatoria inducida por LPS en peces cebra.

Tabla 3. Composición fitoquímica de los extractos metanólicos con potencial antiinflamatorio.

Nombre científico	CF	FL	CU	SA	T	AL	L	AT
<i>Cestrum aff. peruvianum</i>	+	-	++	++	++	-	-	-
<i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	-	-	-		+	-	-	-
<i>Oenothera tetraptera</i> Cav.	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Peperomia aff. galioides</i>	-	-	-	+	+	-	+	-
<i>Galium</i> sp.	+	+	+ ^a	+	-	-	-	-
<i>Passiflora ampullaceae</i>	++	+	-	-	+	-	-	-
<i>Ambrosia arborescens</i>	-	-	-	+	+	-	-	-

CF:compuestos fenólicos; FL:flavonoides; CU:cumarinas; SA:saponinas; T:terpenoides; AL: alcaloides; L: lignanos; AT: ácido tánico.

^a escopoletina

tos fenólicos, composición comparable a lo reportado para *Cestrum nocturnum*, que posee saponinas esteroidales [24]. Dada la importante actividad registrada en el presente trabajo, sería conveniente realizar estudios complementarios para determinar el grupo de compuestos responsables de la actividad, así como su mecanismo de acción. *Galinsoga parviflora*, especie utilizada en Loja-Ecuador para tratar dolores

articulares, también mostró buena actividad antiinflamatoria; la misma que ha sido estudiada a través del ensayo *in vitro* de inhibición de la 5-lipoxigenasa [25]; mientras que en el presente estudio se utilizó un ensayo *in vivo* de valoración de migración leucocitaria. Su actividad antioxidante ha sido estudiada *in vitro*, habiéndose demostrado que posee un efecto antioxidante significativo, lo que justifica su uso en enfermedades inflamatorias [26]. Estos resultados validan su uso popular como una hierba antiinflamatoria; sin embargo no son completamente comparables debido a que se trata de ensayos *in vitro* versus un ensayo *in vivo*. En relación a los resultados obtenidos por cromatografía de capa fina, se encontró la presencia de saponinas y terpenoides, en tanto que trabajos similares citan a los flavonoides como los principales compuestos activos de esta planta [26].

Un resultado interesante obtenido en este estudio fue para el extracto metanólico crudo de *Galium* sp., que mostró un 15,2% de inhibición de migración leucocitaria, lo que significó un efecto antiinflamatorio comparable con los controles positivos utilizados. Este resultado se ve respaldado por el reporte del efecto antiinflamatorio de una fracción metanólica de *Galium mexicanum* al inhibir el efecto inflamatorio producido por lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* sobre macrófagos, mediante medición de la secreción de interleucina-6 [27]. El análisis fitoquímico de este extracto en el presente estudio evidenció la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y cumarinas, similar a lo reportado por otro estudio para *Galium spurium*, cuyos grupos constitutivos fueron: flavonoides y compuestos fenólicos [28].

El género *Oenothera* ha sido usado en medicina ancestral por muchas poblaciones del mundo debido a sus numerosas aplicaciones, de entre las cuales destacan la antiinflamatoria. La etnia Kichwa de la Sierra-Loja utiliza la cocción de la raíz de *Oenothera multicaulis* para tratar la “inflamación de calor”; una etnia no especificada de Cañar usa la infusión de la planta para tratar la “inflamación de los riñones”; la comunidad de Saraguro, por otro lado, usa *Oenothera rosea* y otras especies para curar también “la inflamación de los riñones” [10, 11]. Luego de haber probado: *Oenothera laciniata*, *Oenothera multicaulis*, *Oenothera rosea* y *Oenothera tetraptera*, sólo los resultados de la última, fueron comparables con los controles positivos.

Existen evidencias de actividad antiinflamatoria de las otras especies, así: *Oenothera laciniata*, demuestra su actividad antiinflamatoria a través de la inhibición en la producción de óxido nítrico [29]; *Oenothera biennis* y *paradoxa*, a través del ensayo de inhibición de hialuronidasa y lipoxigenasa [30]; y esta última especie, a través de la inhibición de mieloperoxidasa en neutrófilos humanos [31]. En relación a los constituyentes químicos del género *Oenothera*, se han reportado como los principales: lípidos, flavonoides, taninos, esteroides y triterpenos. En este trabajo se encontró para *Oenothera tetraptera*: compuestos fenólicos, saponinas, taninos y alcaloides, correspondiéndose a lo citado. A su vez para esta especie, en otros trabajos, se ha aislado ya ciertos ellagitanninos como Oenotheina A y B con potencial inmunomodulador [32].

En Ecuador, algunos grupos poblacionales usan *Peperomia galioides* para procesos inflamatorios como: lavados post-parto (Azua), paperas (Cañar), dolor de oído (Chimborazo y Cañar), cólicos (Kichwa de la Sierra-Pichincha), fiebre (Imbabura) e “inflamación de calor” (hinchazón) en forma de decocción (Saraguro) [10, 11]. En el Perú se considera el zumo de *Peperomia* (congona) como una alternativa para prevenir y tratar desórdenes relacionados con la secreción ácida gástrica [33]. Aunque no se han encontrado estudios recientes de actividad antiinflamatoria como la demostrada en el presente, Villegas y col. reportan la actividad relacionada a cicatrización de heridas con el extracto de ésta y otras plantas, estudio en el cual el compuesto: (+)-epi-alfa-bisabolol es el terpenoide responsable de dicha actividad [34]. También se ha estudiado la actividad antiinflamatoria de otra especie, *Peperomia pellucida*, en el modelo de edema plantar en ratas exhibiendo actividad antiedematógena [35].

Por otro lado, el análisis fitoquímico (TLC) de *Peperomia galioides* señala que los grupos de compuestos constitutivos fueron: saponinas, terpenoides y lignanos, sugiriendo se continúen con los estudios para relacionar el compuesto químico responsable de la actividad en cuestión.

El género *Passiflora*, dependiendo de la estructura de la planta utilizada tiene

diferentes aplicaciones, de entre ellas las medicinales. Por ejemplo, la etnia Tsachi (Pichincha) usa las hojas de *Passiflora auriculata* para tratar el sarpullido e hinchazones; aplicaciones similares tiene *Passiflora mixta*. *Passiflora ligularis* es utilizada por comunidades de la Sierra ecuatoriana para tratar inflamaciones intestinales y de las vías urinarias [11]. Los resultados de actividad antiinflamatoria de *Passiflora ampullaceae*, obtenidos en el presente trabajo, corroboran su uso tradicional reportado en la bibliografía y por las comunidades de Azuay y Loja. No se encontraron estudios de la misma especie, pero si de otras como *Passiflora edulis* que inhibe la migración celular y mediadores de la inflamación en los modelos de edema plantar [36], comparable con el aplicado en este estudio.

En la cromatografía en capa fina realizada se observó que los constituyentes principales del extracto metanólico de *Passiflora ampullaceae* fueron: compuesto fenólicos y flavonoides, lo que coincide con los compuestos aislados de *Passiflora edulis* (heC-glucosylflavones), a los cuales se les atribuye el efecto antiinflamatorio a través de varios mecanismos de acción como por ejemplo, inhibición de citocinas, expresión de moléculas de adhesión, inhibición de la vía de las ciclooxygenasas, influencia en la migración de leucocitos, etc. [37].

Ambrosia arborescens presentó actividad antiinflamatoria en peces cebra, probablemente por la presencia de terpenoides, compuestos reportados en el presente estudio como constitutivos del extracto metanólico obtenido por percolación. No hay reportes específicos de esta planta que valoren directamente la inflamación, sin embargo si se ha estudiado la actividad de 2 terpenoides aislados de esta planta: dansin y coronopilin sobre el factor nuclear B (NF-B), pues la desregulación de este complejo puede inducir a patologías como inflamación, inmunodeficiencia y cáncer [38].

Finalmente, es importante recordar que la actividad farmacológica es función de la concentración de la sustancia estudiada, en el caso de los extractos de plantas, las concentraciones de dosis máxima tolerada se dio en un rango muy amplio de 400 a 3,125 μg /ml, lo que sugiere que hay que valorar el potencial riesgo de toxicidad en su uso etnomédico.

4. Conclusiones

El modelo de peces cebra es un modelo novedoso dentro de nuestro medio, pues constituye un modelo de bajo costo que permite el análisis de extractos de plantas para diferentes actividades farmacológicas como la antiinflamatoria.

De los 37 extractos probados, el 18,92% presenta un potencial antiinflamatorio farmacológicamente comparable con indometacina y dexametasona, destacando *Cestrum aff. peruvianum* a concentración de 50 μg /ml.

Existen plantas actualmente usadas por la población que dada su baja MTC presentan un riesgo de toxicidad en el uso tradicional, tal es el caso de *Cestrum aff. peruvianum* (50 μg /ml) y *Peperomia aff. galioides* (6,25 μg /ml).

Los resultados de este estudio, confieren un respaldo científico al uso tradicional de algunas de las plantas empleadas por las comunidades aborígenes y mestizas del Ecuador como alternativas de tratamiento para procesos inflamatorios.

Adicionalmente, con la finalidad de comprender mejor el perfil farmacológico de los extractos positivos, se requiere el análisis de la curva dosis-respuesta conjuntamente con la separación de los diferentes compuestos presentes en los extractos mediante diferentes técnicas analíticas.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó dentro del programa de cooperación interinstitucional VLIR-IUC/U.Cuenca - Facultad de Ciencias Químicas.

Referencias

- [1] L. I. Zon and R. T. Peterson, "In vivo drug discovery in the zebrafish," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 1, p. 3544, 2005.
- [2] M. Matthews, B. Trevarrow, and J. Matthews, "A virtual tour of the guide for zebrafish users," *Resource*, vol. 31, p. 3440, 2002.
- [3] A. D. Crawford, C. V. Esguerra, and P. A. de Witte, "Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery," *Planta Med.*, vol. 74, no. 6, p. 624632, 2008.
- [4] H. P. Rang, *Farmacologa: Rang y Dale*. Barcelona: Elsevier, 2008.
- [5] O. Barreiro and F. Sánchez-Madrid, "Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria," *Rev. Esp. Cardiol.*, vol. 62, no. 5, p. 552562, 2009.
- [6] M. Hamalainen, R. Nieminen, P. Vuorela, M. Heinonen, and E. Moilanen, "Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages," *Mediators Inflamm.*, pp. 1–10, 2007.
- [7] G. J. Lieschke, "Fluorescent neutrophils throw the spotlight on inflammation," *Mediators Inflamm.*, vol. 108, no. 13, p. 39613962, 2006.
- [8] M. L. Cordero-Maldonado, D. Siverio-Mota, L. Vicet-Muro, I. M. Wilches-ArizAbala, C. V. Esguerra, P. A. M. de Witte, and A. D. Crawford, "Optimization and pharmacological validation of a leukocyte migration assay in zebrafish larvae for the rapid in vivo bioactivity analysis of anti-inflammatory secondary metabolites," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, p. e75404, 2013.
- [9] C. A. dAlencon, O. A. Peña, C. Wittmann, V. E. Gallardo, R. A. Jones, F. Loosli, U. Liebel, C. Grabher, and M. L. Allende, "A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, p. 151, 2010.
- [10] M. Ríos, *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas*. Ecuador: Ediciones Abya-Yala, 2007.
- [11] L. de la Torre, *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Ecuador: Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, 2008.
- [12] W. H. Organization, *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva: World Health Organization, 2003.
- [13] J. F. Muñoz and D. G. Sarmiento, *Valoración comparativa de dos métodos de secado de plantas medicinales a través de la cuantificación de flavonoides y cumarinas*, 2010.
- [14] W. P. Jones and A. D. Kinghorn, "Extraction of plant secondary metabolites," *Natural products isolation*, vol. 864, p. 323351, 2005.
- [15] R. Voigt, M. Bornschein, and A. N. Cachaza, *Tratado de tecnología farmacéutica*. Acribia, 1982.
- [16] M. Westerfield, *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, 2000.

- [17] S. A. Renshaw, C. A. Loynes, D. M. Trushell, S. Elworthy, P. W. Ingham, and M. K. Whyte, "A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation," *Natural products isolation*, vol. 108, no. 13, p. 39763978, 2006.
- [18] J. R. Mathias, B. J. Perrin, T.-X. Liu, J. Kanki, A. T. Look, and A. Huttenlocher, "Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 80, no. 6, p. 12811288, 2006.
- [19] "Merck, 116303 leucognost pox," http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/LEUCOGNOST-POX,MDA_CHEM-116303#anchor_PI, accessed: 2016-01-07.
- [20] R. Core Team, "The R project for statistical computing," *R Proj. Stat. Comput.*, 2014.
- [21] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley and Sons, 2008.
- [22] D. Shehnaz, F. Hamid, F. T. Baqai, and V. Uddin, "Effect of the crude extract of *cestrum parqui* on carrageenin-induced rat paw oedema and aggregation of human blood platelets," *Phytother. Res.*, vol. 13, no. 5, p. 445447, 1999.
- [23] M. Kawano, M. Otsuka, K. Umeyama, M. Yamazaki, T. Shiota, M. Satake, and E. Okuyama, "Anti-inflammatory and analgesic components from *hierba santa*, a traditional medicine in peru," *J. Nat. Med.*, vol. 63, no. 2, p. 147158, 2009.
- [24] S. B. Baños, L. L. B. Necha, A. N. Hernández, and D. G. Sánchez, "Polvos, extractos y fracciones de hojas de *cestrum nocturnum* l. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *fusarium* spp." *Rev. UDO Agríc.*, vol. 8, no. 1, p. 4251, 2008.
- [25] U. S. Akula and B. Odhav, "In vitro 5-lipoxygenase inhibition of polyphenolic antioxidants from undomesticated plants of south africa," *J. Med. Plants Res.*, vol. 2, no. 9, p. 207212, 2008.
- [26] A. Bazyłko, M. Stolarczyk, M. Derwiszka, and A. K. Kiss, "Determination of antioxidant activity of extracts and fractions obtained from *galinsoga parviflora* and *galinsoga quadriradiata*, and a qualitative study of the most active fractions using tlc and hplc methods," *Nat. Prod. Res.*, vol. 26, no. 17, p. 15841593, 2012.
- [27] P. Bolivar, C. Cruz-Paredes, L. R. Hernández, Z. N. Juárez, E. Sánchez-Arreola, Y. Av-Gay, and H. Bach, "Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *galium mexicanum*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 137, no. 1, p. 141147, 2011.
- [28] M. Gebrelibanos, C. Veeresham, and K. Asres, "Preliminary phytochemical and antibacterial screening on extracts of the aerial parts of *galium spurium* (subspecies-africanum)," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 3, no. 8, p. 2712, 2012.
- [29] G.-J. Yoon, Y. M. Ham, B.-S. Yoo, J.-Y. Moon, J. Koh, and C.-G. Hyun, "Oenothera laciniata inhibits lipopolysaccharide induced production of nitric oxide, prostaglandin e 2, and proinflammatory cytokines in raw264. 7 macrophages," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 107, no. 4, p. 429438, 2009.
- [30] S. Granica, M. E. Czerwińska, J. P. Piwowarski, M. Ziaja, and A. K. Kiss, "Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *oenothera biennis* l. and *oenothera paradoxa* hudziok obtained after seeds cultivation," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, p. 801810, 2013.

- [31] S. Singh, R. Kaur, and S. K. Sharma, "An updated review on the oenothera genus," *J Chin Integr Med*, vol. 10, p. 717725, 2012.
- [32] T. Yoshida, Y. Amakura, and M. Yoshimura, "Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order myrtales," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 79–106, 2010.
- [33] G. Marcial, C. Rodríguez, G. F. de Valdez, and M. Medici, "New approaches in gastritis treatment," *Gastritis and Gastric Cancer - New Insights in Gastroprotection, Diagnosis and Treatments*, INTECH Open Access Publisher, 2011.
- [34] L. F. Villegas, A. Marcalo, J. Martin, I. D. Fernández, H. Maldonado, A. J. Vaisberg, and G. B. Hammond, "(+)-ep i--bisbolol is the wound-healing principle of *peperomia ga lioides*: Investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids," *J. Nat. Prod.*, vol. 64, no. 10, p. 13571359, 2001.
- [35] M. F. Arrigoni-Blank, R. L. Oliveira, S. S. Mendes, P. A. Silva, A. R. Antonioli, J. C. Vilar, S. C. Cavalcanti, and A. F. Blank, "Seed germination, phenology, and antiedematogenic activity of *peperomia pellucida* (L.) HBK," *BMC Pharmacol.*, vol. 2, no. 1, p. 12, 2002.
- [36] J. P. Benincá, A. B. Montanher, S. M. Zucolotto, E. P. Schenkel, and T. S. Frode, "Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *passiflora edulis*," *Food Chem.*, vol. 104, no. 3, p. 10971105, 2007.
- [37] A. J. Vargas, D. S. Geremias, G. Provensi, P. E. Fornari, F. H. Reginatto, G. Gosmann, E. P. Schenkel, and T. S. Frode, "*Passiflora alata* and *passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy," *Fitoterapia*, vol. 78, no. 2, p. 112119, 2007.
- [38] R. Villagomez, G. C. Rodrigo, I. G. Collado, M. A. Calzado, E. Muñoz, B. Akeson, O. Sterner, G. R. Almanza, and R.-D. Duan, "Multiple anticancer effects of damsine and coronopilin isolated from *ambrosia arborescens* on cell cultures," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 3799–3805, 2013.