

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA E INMUNOMODULADORA DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO DE LAS HOJAS DE *Chuquiraga lessing* "HUAMANPINTA"

Antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity of chloroform extract of the leaves of *Chuquiraga lessing* "Huamanpinta".

Emilio Ramírez¹, Pablo Bonilla², Silvia Suarez³, Fritz Choquesillo², Américo Castro²

¹Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

²Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", Facultad de Farmacia y Bioquímica.

³Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron las actividades antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" y se realizó la identificación de metabolitos secundarios y elucidación estructural de flavonoides, se evaluó la actividad antioxidante mediante el método del difenilpicrilhidrazilo (DPPH) y se midió la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y malondialdehído (MDA). Para analizar la actividad antiinflamatoria se empleó el método del edema subplantar según Winter; y para la actividad inmunomoduladora el método de velocidad de aclaramiento de la tinta china. Se identificaron flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas. Por análisis espectroscópico UV se elucidaron los flavonoides: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona; 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavanona; 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona y 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona. La actividad antioxidante *in vitro* de 86,4% (300 µg/mL) e *in vivo* aumentan la actividad de las enzimas antioxidantes CAT (2146,8 UI/mL sangre), SOD (10,12 UI/mL sangre) y reduce la lipoperoxidación como MDA (3,6 µmol/mL sangre) a 300 mg/kg de peso. La mayor actividad antiinflamatoria del extracto fue a 300 mg/kg (39,1%) y la actividad inmunomoduladora fue a 200 mg/kg (48,23%). Se concluye que el extracto clorofórmico presenta actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora.

Palabras clave: *Chuquiraga lessing*, huamanpinta, actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, enzimas antioxidantes, lipoperoxidación.

SUMMARY

In the present study were evaluated the antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity of chloroform extract from the leaves of *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" and was performed the identification and structure elucidation of flavonoid secondary metabolites, antioxidant activity was evaluated by the method of difenilpicrilhidrazil (DPPH) and was measured the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA). To analyze anti-inflammatory activity was used subplantar edema method according Winter; and to immunomodulatory activity the method of speed of clearing of ink. Flavonoids, triterpenes, steroids, alkaloids, tannins, phenolic compounds, sesquiterpene lactones were identified. With UV spectroscopic analysis the following flavonoids were elucidated: 5,6,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona; 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavanona; 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona; 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona. The *in vitro* antioxidant activity of 86,4% (300 µg/mL) and *in vivo* increases the activity of antioxidant enzymes CAT (2146,8 IU/mL blood), SOD (10,12 IU/mL blood) and reduces lipid peroxidation as MDA (3,6 µmol/mL blood). Most inflammatory efficiency was 300 mg/kg (39,1%) and immunomodulatory activity was 200 mg/Kg (48,23%). It is concluded that chloroform extract presents antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity.

Keywords: *Chuquiraga lessing*, huamanpinta, anti-inflammatory and immunomodulatory, antioxidant enzymes, lipid peroxidation.

INTRODUCCIÓN

Siendo los metabolitos secundarios de las plantas medicinales los responsables de sus efectos terapéuticos, se hace necesario extraerlos, purificarlos y elucidar su estructura química empleando métodos modernos de fitoquímica ^(1,2).

Chuquiraga lessing "huamanpinta" es una especie con uso terapéutico de la familia de las Asteraceae, crece en los andes del Perú sobre los 3500 metros de altitud y es utilizada como antiinflamatorio, analgésico, diurético, para el tratamiento de enfermedades prostáticas y en cáncer genitourinario ^(3,4).

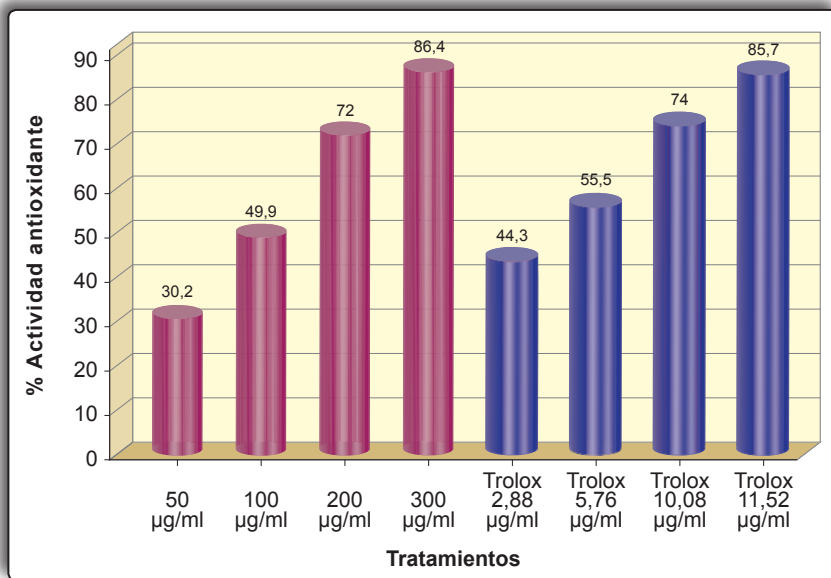


Figura 1. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

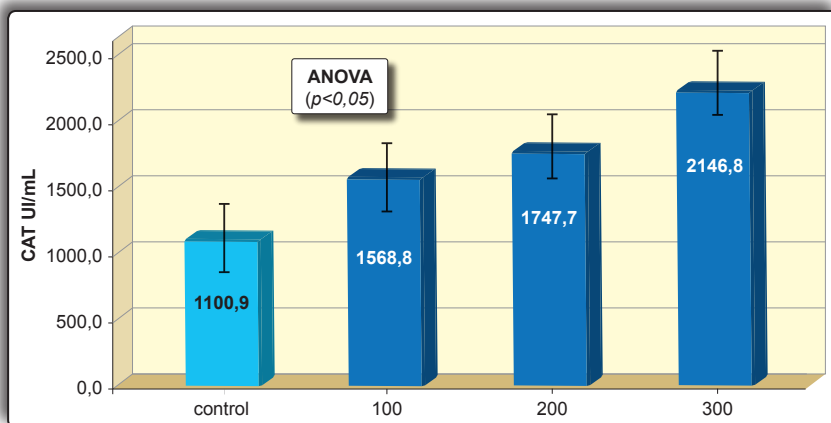


Figura 2. Promedio de niveles sanguíneos de Catalasa (sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

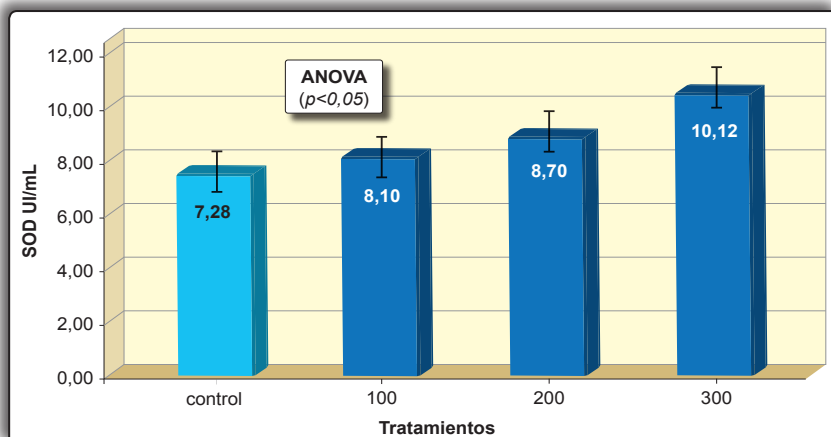


Figura 3. Promedio de niveles sanguíneos de superóxido dismutasa (UI SOD/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

La inflamación es el resultado de la interacción de células y otros factores presentes en los tejidos en respuesta a una injuria externa, con producción de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs). Entre los posibles mecanismos subyacentes de este desbalance está el inadecuado metabolismo del ácido araquidónico, el cual vía la enzima ciclooxigenasa (COX) genera mediadores pro-inflamatorios sindicados para la mayoría de eritemas causados durante la inflamación aguda ⁽⁵⁾.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria e inmunomoduladora de la especie en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Chuquiraga lessing "huamanpinta" fue colectada en el distrito de Vinchos de la Provincia de Huamanga, región Ayacucho a 3900 metros de altitud. El material fue clasificado en el Museo de Historia Natural. Luego fue desecado a una temperatura de 40°C.

Preparación del Extracto:

Un kg de hojas secas y molidas fueron desengrasadas con éter de petróleo y maceradas con 2,5 L de cloroformo por siete días. Se filtró y evaporó el solvente para obtener el extracto, el cual fue conservado en frasco ámbar.

Marcha fitoquímica

Se realizó con la finalidad de identificar los metabolitos secundarios ⁽⁵⁾, entre ellos los flavonoides. Se empleó cromatografía en capa fina y a escala preparativa para identificar y separar los flavonoides. La elucidación estructural se realizó por espectroscopia UV-Visible en metano, para su caracterización química se realizó un barrido espectral UV-Visible.

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

| Metabolitos secundarios | Reacción | Resultados | Observaciones |
|-----------------------------------|---------------------|------------|----------------------------|
| Glicosidos | Molish | ++ | Coloración violeta |
| | Dragendorf | ++ | Precipitado rojo |
| Alcaloides | Mayer | ++ | Precipitado blanco |
| | Popof | ++ | Precipitado amarillo |
| | Gelatina | ++ | Precipitado blanco |
| Taninos | Agua de bromo | ++ | Precipitado amarillo |
| | Ninhidrina | -- | |
| Flavonoides | Shinoda | +++ | Coloración roja |
| Compuestos fenólicos | Cloruro férrico | ++ | Coloración verde |
| Saponinas | Ensayo de espuma | -- | |
| Triterpenos y/o esteroides | Liebermann-Burchard | +++ | Coloración verde azulada |
| Lactonas sesquiterpénicas | Bajlet | + | Coloración naranja |
| Antronas y naftoquinonas | Borntrager | + | Coloración rojo claro |
| Principios amargos y astringentes | Organoléptico | ++ | Sabor amargo y astringente |

(-): No se evidencia presencia, (+): Presencia de trazas, (++) : Presencia moderada, (+++): Presencia abundante

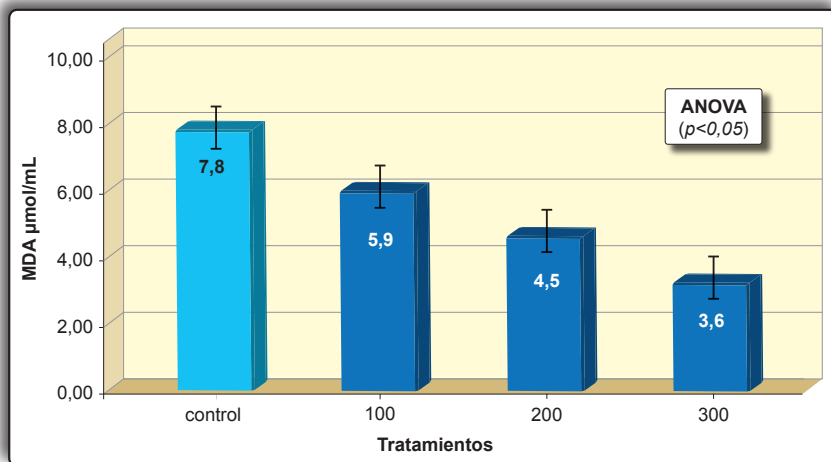


Figura 4. Promedio de niveles sanguíneos de Malondialdehído (µmoles/mL sangre) por la administración del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

Material biológico

Se emplearon ratas macho (*Rattus norvegicus*) cepa Holtzman de 200 a 250 g de peso y ratones (*Mus musculus*) entre 18 y 25 g de peso, adquiridos en el Instituto Nacional de Salud de Chorrillos, los que fueron alojados y aclimatados en jaulas individuales *ad libitum* a una temperatura ambiental entre 23 a 26°C, humedad relativa de 60 a 70% con 12 horas de luz/ oscuridad.

Actividad antioxidante in vitro

Se utilizó el método del 1,1-difenil-2-picril hidrazilo hidratado (DPPH) en solución n-butanólica a concentración de 20 mg/L, cuatro soluciones butanólicas del extracto a concentraciones de 900, 600, 300 y 150 µg/mL y un blanco en butanol para calibración del espectrofotómetro a cero y su posterior

lectura de absorbancia a 517 nm ⁽⁶⁻⁸⁾.

Actividad antioxidante in vivo

Se midió la actividad de los marcadores biológicos: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y el malondialdehído (MDA) ⁽⁶⁾. Se emplearon 28 ratas, distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos de siete ratas cada uno, administrando el

extracto a 100, 200 y 300 mg/kg de peso por vía oral durante cinco días. Al sexto día, se anestesiaron con éter etílico para extraer sangre por punción cardiaca y realizar la hemólisis para determinar la actividad de la superóxido dismutasa por el método Marklund y Marklund, la catalasa por el método de Aebi y la lipoperoxidación por el TEARS, citado por Suárez.

Actividad antiinflamatoria

Fue evaluada mediante el modelo biológico de edema subplantar inducido por carragenina, descrito por Winter y posteriormente modificada por Arroyo *et al* ⁽⁹⁾. Se emplearon 42 ratas sometidas a ayuno 12 horas antes de iniciar el ensayo, con libre acceso de agua y distribuidas aleatoriamente en seis grupos de siete ratas cada uno. Se administraron ibuprofeno 120 mg/kg y prednisona 1,2 mg/kg, como estándares, y el extracto a 100, 200 y 300 mg/kg de peso. En el porcentaje de inhibición de la inflamación, se calculó la media de los incrementos de volumen de cada lote a 0,5; 1; 2; 3; 5 y 7 horas y se aplicó la siguiente fórmula:

$$EAI = \frac{(D/D_0 - d/d_0)}{D/D_0} \times 100$$

Donde:

- EAI : Eficiencia antiinflamatoria.
- D/D₀: Incremento diámetro del blanco, referido al diámetro inicial (D₀).
- d/d₀: Incremento diámetro inflamado tratado con un agente antiinflamatorio, referido al diámetro inicial (d₀).
- u : Viscosidad dinámica en centipoises. (g/cm.seg)

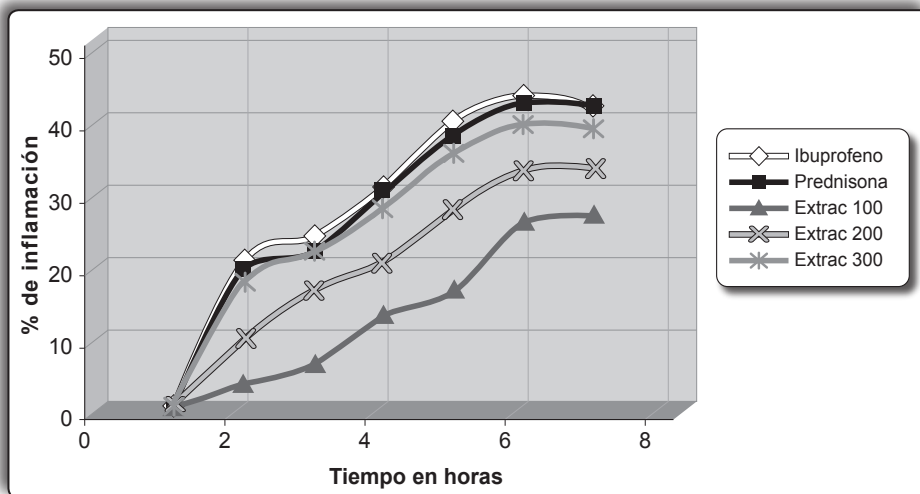


Figura 6. Porcentaje de la eficiencia antiinflamatoria del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta".

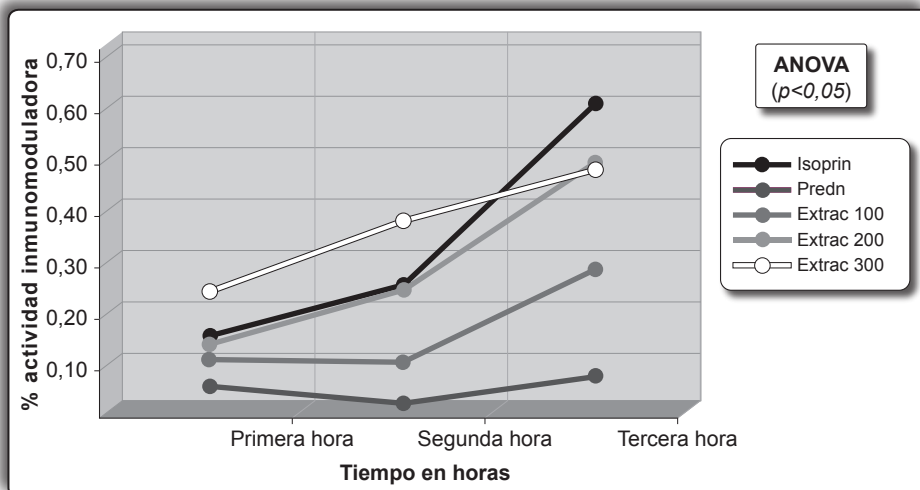


Figura 7. Actividad inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* "huamanpinta" frente al isoprinosine y prednisona.

Actividad inmunomoduladora

Se utilizó el método de velocidad de aclaramiento de la tinta china descrito por Arroyo *et al* ⁽¹⁰⁾, empleándose 42 ratas en seis grupos de siete cada uno. Se extrajo sangre por punción cardiaca para determinar la fórmula leucocitaria y se administró por vía oral, al control, suero fisiológico; isoprinosine 300 mg/kg y prednisona 60 mg/kg como estándares, y el extracto a 100, 200 y 300 mg/kg de peso por cinco días. Después de 24 horas se administró, a cada animal de todos los grupos, 0,5 mL de tinta china 10% vía endovenosa en suero fisiológico, a través de la vena sagital de la cola. Se anestesiaron con éter etílico para extraer sangre por punción cardiaca y en tres tiempos (1, 2 y 3 horas, respectivamente). La hemólisis de la sangre se realizó

midiendo 0,1 mL con 4,9 mL de agua bidestilada para leer su absorbancia en el espectrofotómetro a 650 nm.

RESULTADOS

Los resultados se muestran en las diferentes figuras y tabla.

DISCUSIÓN

El estudio fitoquímico demostró la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, lactonas, antronas, naftoquinonas y principios amargos. Los resultados muestran que son los flavonoides, los triterpenos y esteroides los más abundantes en este extracto y serían los responsables del efecto antioxidante, antiinflamatorio e inmunomodulador ⁽¹⁾ (tabla 1).

Se encontró en las fracciones F2, F3, F7 y F8 flavonoides del grupo de las flavonas y flavanonas, sugiriéndose las estructuras de 4 flavonoides por comparación con espectros UV obtenidos en la literatura por Mabry *et al* ⁽¹¹⁾, así se relacionó F2 con 5,6,7-trihidroxi-4'-

metoxiflavona, F3 3' con 5, 6, 7-trihidroxi - 4'-metoxi flavanona, F7 con 4' 5, 7, 8-tetrahidroxiflavona y F8 con 5,7, 8-trihidroxi-4'-metoxi flavona (figura 4).

La figura 1 expresa, en porcentajes, la actividad antioxidante obtenida a las concentraciones de 50, 100, 200 y 300 µg/mL, las que fueron de 30,2; 49,9; 72,0 y 86,4%, respectivamente, comparados con trolox, el cual presentó una actividad antioxidante de 44,3; 51,5; 74,0 y 85,7%, respectivamente. De igual forma se calculó el IC₅₀ para el trolox, obteniéndose 3,4 µg/mL, y el IC₅₀ para el extracto que fue de 218,35 µg/mL, encontrándose una capacidad antioxidante equivalente a trolox-DPPH de 0,016 µgTrolox/µg de extracto. De acuerdo a los resultados del estudio químico realizado, son los flavonoides, triterpenos

y esteroides los responsables de la actividad antioxidante ^(1,3).

La actividad de la catalasa y la superóxido dismutasa es dosis dependiente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control. En general las enzimas antioxidantes SOD y catalasa aumentan sus actividades a las concentraciones de 200 y 300 mg/kg de peso (figura 2 y 3), esto sugiere que el extracto contiene metabolitos secundarios que coadyuvan o protegen a las enzimas antioxidantes, como por ejemplo los flavonoides ^(1,3). El efecto de los metabolitos encontrados en el extracto sobre las enzimas SOD y CAT pueden estar asociados a un incremento de la expresión o a un aumento en la actividad de estas enzimas, lo cual ha sido sugerido por otros autores ^(6,8).

La peroxidación lipídica es significativamente menor en los extractos respecto al control (figura 4) ⁽¹²⁾. Así, el valor basal (control) de MDA es de 7,8 $\mu\text{mol/mL}$ sangre, mientras que para los tratamientos alcanza valores de 5,9; 4,5 y 3,3 $\mu\text{mol/mL}$ de sangre, respectivamente, lo que representa una disminución importante ⁽¹³⁾, y por lo tanto, estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

El extracto presenta actividad antiinflamatoria en todos los grupos tratados respecto al control siendo mayor a las concentraciones de 200 (32,9%) y 300 (38,6%) mg/kg de peso (figura 5 y 6).

Asimismo, el extracto a 200 y 300 mg/kg, aumenta la respuesta inmune en un 48,23% y 46,78%, respectivamente, en comparación al estándar isoprinosine 59,9% ($p < 0,05$). También se observa que la prednisona reduce la respuesta inmune (6,43%) en forma significativa ($p < 0,05$), al disminuir el número de linfocitos circulantes; resultados similares fueron reportados por Bonilla ⁽¹⁾. La actividad inmunomoduladora se hace más importante a partir de las dos horas, donde el extracto de 300 mg/kg muestra un efecto constante en comparación al extracto de 200 mg/kg, pero ambos con valores cercanos al estándar isoprinosine (figura 7) y estadísticamente significativos con $p < 0,05$.

CONCLUSIONES

En el estudio fitoquímico se encontraron flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas, antronas, principios amargos y astringentes.

Se elucidó la estructura química de los siguientes flavonoides: 5,6,7-trihidroxi-

4'-metoxiflavona; 3',5,6,7-tetrahidroxi-4'-metoxiflavanona; 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona y 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona.

La actividad antioxidante del extracto *in vitro* fue de 86,4% (300 $\mu\text{g/mL}$) e *in vivo* aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes CAT (2146,8 UI/mL sangre), SOD (10,12 UI/mL sangre) y reduce la lipoperoxidación como MDA (3,6 $\mu\text{mol/mL}$ sangre).

El extracto presentó la mayor actividad antiinflamatoria a la dosis de 300 mg/kg (39,1%) y 200 mg/kg de peso (32,7%); y una actividad inmunomoduladora de 48,23% (200 mg/kg) y de 46,78% (300 mg/kg) siendo significativos ($p < 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonilla P. Flavonoides de *Ephedra americana* (pinco-pinco), acción biológica sobre el sistema inmunológico (IgE). [Tesis para optar el Grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica]. Facultad Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2001.
- Casado R, Landa A, Calvo J, Garcia-Mina J, Marston A, Hostettmann K, *et al.* Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. *Biol. Pharm.* 2011; 49 (6): 620-6.
- Chávez H, Molina A, Ramos R, Ferreyra C, Revatta L. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios bioactivos de *Chuquiraga spinosa* "humanpinta". I Congreso Internacional y III Congreso Nacional de Investigación Científica Tecnológica. Libro de resúmenes. Ica, 2011.
- Torres M. Actividad antiinflamatoria prostática del extracto atomizado de la especie *Chuquiraga spinosa* Lessing "qarisirwi" en *Canis familiaris*. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, 2004.
- Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana-Cuba. La Habana, 2000. p. 23-33.
- Suárez S. Antioxidantes en recursos fitoterapéuticos. Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2006.
- Ramos E, Castañeda B, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Perú Salud* 2008; 15(1).
- Sánchez J, Faure R, Martínez G, Vega E, Fernández O. Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Rev Cubana Salud Animal.* 2009. 31(3): 170-175.

9. Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de investigación farmacológica. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2012.
10. Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. Manual de modelos experimentales de farmacología. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2004.
11. Mabry T, Markhan K, Thomas M. The systematic identification of Flavonoids. Springer-Verlag. Berlin, 1970; p: 16-147.
12. Suárez S, Oré R, Arnao I, Rojas L, Trabucco J. Extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física. *An Fac Med* 2009; 70(3): 175-80.

Manuscrito recibido el: 15/08/14

Aceptado para su publicación el: 04/09/2014

Correspondencia:

Nombre: Emilio Ramírez Roca
Dirección: Calle Droseras 134, Salamanca-Ate
Email: emilioramirezroca@hotmail.com