

# ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Gnaphalium Stramineum* HBK (sanalotodo)

L. Rastrelli(1), M. Hernández(2), A. Saravia(2), L. Madariaga(2) y F. De Simone(1)

## RESUMEN

La presente investigación fue realizada con el propósito de evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones cromatográficas de las flores de la especie *Gnaphalium stramineum* HBK (Sanalotodo) y aislar él o los principales activos responsables de dicha actividad. Los ensayos *in vivo* de actividad antiinflamatoria y el estudio fitoquímico realizado, han permitido aislar compuestos derivados del ácido cafeoilquinico y glicósidos flavonoidales como los principales principios activos responsables de dicha actividad farmacológica.

## INTRODUCCION

En Guatemala, la infusión de flores de la especie *Gnaphalium stramineum* HBK (Sanalotodo) es comúnmente empleada en medicina tradicional como agente antiinflamatorio, sin embargo, la información farmacológica y fitoquímica que valide dicha actividad antiinflamatoria es escasa. Como consecuencia de lo anterior, la presente investigación ha pretendido fundamentar científicamente la utilización medicinal de dicha especie, para lo cual se ha realizado un tamizaje completo de la actividad antiinflamatoria de una serie de extractos y fracciones cromatográficas obtenidos a partir

de las flores de dicha especie, así como también un estudio fitoquímico profundo de los componentes presumiblemente responsables de la actividad farmacológica antes mencionada. Tomando como base estudios anteriores realizados con otras especies medicinales (Aquino *et al* 1991; y, Peluso *et al* 1995) se procedió con la estructuración de 4 fases de estudio, iniciándose con la comprobación de la actividad antiinflamatoria de la infusión de flores de la especie sujeta al estudio (Fase I), siguiéndose con la evaluación de la actividad antiinflamatoria de tres extractos de diferente polaridad: hexánico, metanólico y acuoso (Fase II), para posteriormente proceder al fraccionamiento grueso mediante partición líquido-líquido y cromatografía en columna de exclusión de tamaño del extracto que mejor respuesta antiinflamatoria mostró en la fase anterior, que en el presente estudio fue el extracto metanólico (Fase III), para finalmente concluir con el estudio fitoquímico a profundidad de las fracciones que mejor respuesta antiinflamatoria mostraron en la fase anterior (Fase IV), aislándose durante esta fase cuatro derivados del ácido cafeoilquinico: ácido 4-O-cafeoilquinico (1), ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico (2), ácido 4,5-di-O-cafeoilquinico (3), ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquinico (4) y tres

glicósidos de tipo flavonoidal, siendo estos: quercetina 3-galactopiranosido (5), quercetina 3-galacto-piranosido (6) y quercetina 3-rutinopiranosido (7).

La actividad inhibitoria de derivados del ácido cafeoilquinico sobre la peroxidación lipídica a nivel mitocondrial y microsomas hepáticos, sobre la liberación de histamina a nivel celular y sobre la síntesis de leucotrieno B4 inducido por calcio ionóforo A 23187 en leucocitos polimorfonucleares humanos, ha sido ampliamente demostrada (Kimura *et al*, 1984, 1985 y 1987). Por otro lado, los roles jugados por los derivados del ácido cafeoilquinico en la modulación de quimiotaxis y en la activación de células inmunocompetentes, tales como los monocitos, normalmente envueltos en reacciones inflamatorias, son bien conocidos. Estudios previos realizados con los compuestos 2, 3 y 4 han demostrado la actividad antiinflamatoria *in vitro* de los dos primeros, mientras que el tercero resultó ser inactivo (Peluso *et al*, 1995). Sin embargo, aunque el compuesto 4 ha resultado ser inactivo como antiinflamatorio *in vitro*, el mismo reviste un especial interés dado que se ha demostrado que posee, al igual que el compuesto 3, actividad inhibitoria *in vitro* en la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y

(1) Centro Interdepartamentale di Chimica, Biologia e Tecnologia Farmaceutica (CICBTF), Facoltà di Farmacia, Università di Salerno, Italia.

(2) Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

por otro lado es inhibidor de la DNA polimerasa, lo que implica cierto potencial como anticancerígeno (Mahmood *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 1989). Con respecto a los glicósidos flavonoidales, también su actividad antiinflamatoria ha sido plenamente demostrada (Van-Wauwe and Gossenc, 1983; Amellal *et al.*, 1985; Moroney *et al.*, 1988; Vlaskovska *et al.*, 1990).

## MATERIALES Y METODOS

**Material vegetal:** el material vegetal fue colectado en el país, y constituyó una muestra mixta de las localidades de Quiché y Zacapa.

**Extracción:** Se utilizó el esquema extractivo según Ciulei (1982), preparándose sucesivamente tres extractos: hexánico, metanólico y acuoso, obteniéndose 8.16, 46.5 y 19.7 g de extractos pilulares, respectivamente.

**Fraccionamiento grueso:** Parte del extracto metanólico obtenido (10 g) fue fraccionado mediante líquido-líquido entre n-butanol y agua. La porción soluble en n-butanol, fue reconcentrada hasta obtener un extracto pilular (4 g) el cual fue disuelto en metanol y fraccionado mediante cromatografía en columna de exclusión de tamaño, utilizándose para ello una columna de 60 x 4 cm con Sephadex LH-20, utilizando metanol como fase móvil, y colectándose fracciones de 9 ml cada una. Las fracciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina [Silicagel 60 F<sup>254</sup>, BuOH:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (60:15:25)] y se reunieron aquellas que fuesen similares, obteniéndose finalmente cinco fracciones: I (280 mg), II (340 mg), III (363 mg), IV (586 mg) y V (163 mg).

**Fraccionamiento fino:** Las fracciones III y IV fueron posteriormente fraccionadas mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) utilizándose una columna C<sub>18</sub>  $\mu$ -Bondapak (30 cm x 7.8 mm d.i., flujo de 3 ml/min) usándose una mezcla metanol:agua (45:55), obteniéndose los compuestos puros: (1) ácido 4-O-cafeoilquinico (35 mg), (2) ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico (37.7 mg), (3) ácido 4,5-di-O-cafeoilquinico (30.8 mg), (4) ácido 3,4,5-tri-O-cafeoilquinico (31.6 mg), (5) quercetina 3-glucopiranosido (35 mg), (6) quercetina 3-galacto-piranosido (106 mg) y (7) quercetina 3-rutinopiranosido (115 mg). Los compuestos 1-4 corresponden a la fracción III y los compuestos 5-7 corresponden a la fracción IV.

**Identificación:** se establecieron los parámetros espectroscópicos <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>13</sup>C DEPT NMR.

**Ensayo antiinflamatorio:** para la demostración de la actividad antiinflamatoria se utilizó la metodología de inducción de edema en la pata trasera de rata según Winter *et al.* (1962) y la modificación para ratón hecha por la universidad de Valencia (CYTED-1995). Cuando fue posible se prefirió el protocolo para rata (extractos), utilizándose el protocolo para ratón sólo cuando las sustancias de prueba tenían muy bajos rendimientos (fracciones y extractos). Para cada extracto se ensayaron 6 dosis, mientras que para cada fracción se ensayaron 4 dosis. Como fármaco de referencia se utilizó fenilbutazona (150 mg/Kg para rata y 80 mg/Kg para ratón). También se contó con un grupo control, al que únicamente se le administró el vehículo utilizado para suspender los extractos y

fracciones. La inducción del edema se realizó mediante la inyección subplantar de una solución de carragenina al 1%. El edema producido se cuantificó mediante pletismometría digital (Ugo Basile), midiendo el volumen de la pata del animal al inicio y a las 1, 3 y 5 horas de inducido el edema. Los resultados fueron transformados a % de inflamación para cada animal, y con los datos generados se construyó una curva de porcentaje de inflamación versus tiempo, calculándose seguidamente mediante integración numérica el área la curva como variable de respuesta.

**Diseño experimental:** para el caso de extractos se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con varias réplicas por bloque, constituido por 5 tratamientos, 3 bloques, y 4 réplicas por bloque, escogiéndose un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

**Análisis estadístico:** Con las áreas bajo la curva calculadas para cada animal de cada tratamiento, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías para el caso de extractos y de una vía para el caso de fracciones. Al establecerse diferencia significativa se procedió a realizar la prueba de Dunnet para evaluar el efecto antiinflamatorio de cada tratamiento con respecto al grupo control. Posteriormente, y para fines ilustrativos, las áreas bajo la curva fueron transformadas a valores de % de inhibición con respecto al grupo control y % de inhibición con respecto al grupo del fármaco de referencia (fenilbutazona).

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos mostraron que de los extractos, hexánico, metanólico y acuoso, sólo los dos primeros tuvieron actividad

estadísticamente significativa, el primero a dosis de 200 mg/Kg y el segundo a dosis de 140 mg/Kg, considerándose en consecuencia que el extracto metanólico fue el de mejor respuesta antiinflamatoria de los tres (32% de inhibición con respecto al control y 82% de inhibición con respecto al fármaco de referencia). En lo referente a las fracciones estudiadas se estimó que la fracción III fue la de mejor respuesta antiinflamatoria, pues fue activa a dosis de 100 mg/Kg de peso, mostrando un 42% de inhibición con respecto al control y un 81% de inhibición con respecto al fármaco de referencia, mientras que la fracción IV fue activa sólo a dosis de 120 mg/Kg de peso.

En lo referente al estudio fitoquímico, se pudo establecer que la fracción III contenía los compuestos 1-4, mientras que la IV contenía a los compuestos 5-7. Los compuestos 1-7 fueron identificados mediante comparación de sus parámetros espectroscópicos ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{13}\text{C}$  DEPT NMR) con los

valores reportados en la literatura (Timmerman *et al.*, 1983; Rastrelli *et al.*, 1995).

## CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluye que la actividad antiinflamatoria de las flores de *Gnaphalium stramineum* HBK (Sanalotodo) es principalmente atribuible a sus componentes derivados del ácido cafeoilquínico en complicidad con glicósidos flavonoidales, posiblemente mediante una acción sinérgica de los mismos. No se descarta que una serie de compuestos no aislados e identificados coadyuven con la actividad antiinflamatoria de los compuestos anteriormente señalados.

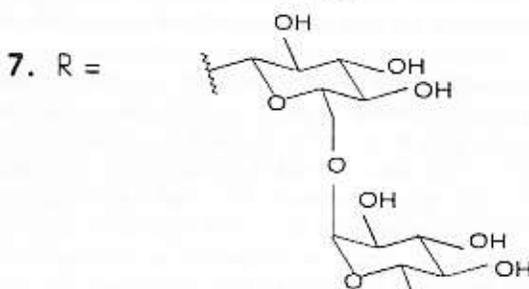
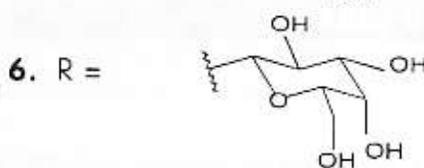
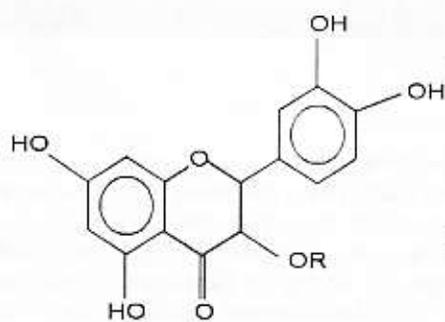
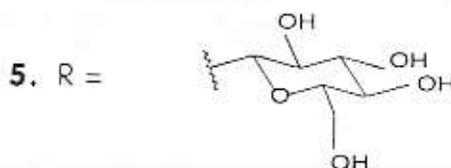
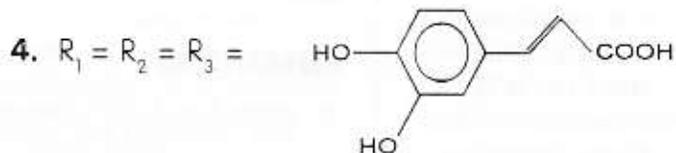
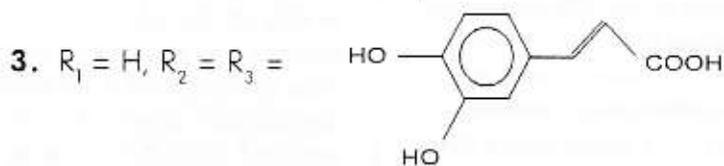
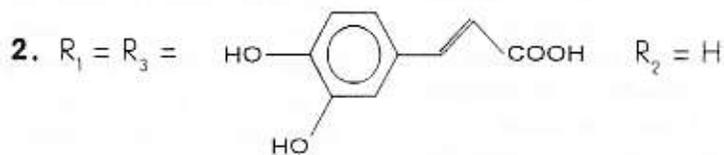
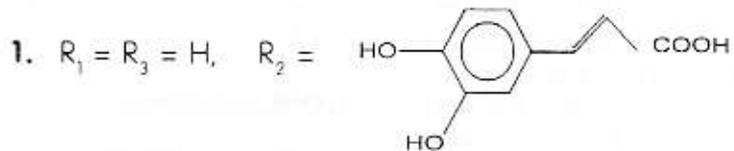
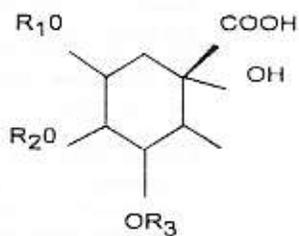
## REFERENCIAS

- 1) Aquino R, *et al.* (1991) Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria Tomentosa*. *J. Nat. Prod.* 54 (2), 453-459.
- 2) Peluso G, *et al.* (1995) Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. *J. Nat. Prod.* 58 (5), 639-646.
- 3) Kimura Y, *et al.* (1984) Studies on the activities of tannins and related compounds. V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Medica* 50, 473-477.
- 4) Kimura Y, *et al.* (1985) Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VI. Inhibitory effects of caffeoylquinic acids on the histamine release from rat peritoneal mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* 33 (2), 660-666.
- 5) Kumura *et al.* (1987). Studies on the activities of tannins and related compounds. X. Effects of caffeotannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Nat. Prod.* 50, 397.
- 6) Moroney M. (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 40, 787.
- 7) Amellal M, *et al.* (1985). Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and biflavonoids. *Planta Medica*, 16-20.
- 8) Timmerman B, *et al.* (1983) Constituents of *Chrysotamnus paniculatus*. 3,4,5-tricafeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-, 3, 5- and 4,5-dicafeoylquinic acids. *J. Nat. Prod.* 46 (3), 365-368.
- 9) Rastrelli L, *et al.* Studies on the constituents of *Chenopodium pallidicaule* (Cañhua) seeds. Isolation and characterization of two new flavonol glycosides. *J. Agric. food Chem.* 43 (8), 2020-2024.

## NOTA INFORMATIVA DE CIBA

### PANTROPAZOL

Es un estudio de 106 pacientes con úlcera del esófago, estómago y duodeno que no respondieron al tratamiento con Ranitidina a dosis elevadas durante 3 ó más meses, iniciaron tratamiento con Pantoprazol (40-80 mg, p.O.) diariamente, el 96.7% de los pacientes con úlcera se curaron en un transcurso de 2 a 8 semanas, y el 2.3% de los pacientes se curaron en 12 semanas. Sólo en un paciente con esofagitis severa la lesión tardó más de 6 meses a 3 años. Durante la terapia de mantenimiento, la enfermedad péptica se mantuvo en remisión en la mayoría de los pacientes con 40 mg de Pantoprazol. Doce pacientes con esofagitis y dos con úlcera gástrica requirieron de dosis mayores (80-120 mg) para controlar su padecimiento. Una paciente desarrolló edema periférico, el cual desapareció rápidamente al discontinuar el tratamiento. No se observaron efectos adversos posteriores relacionados con el medicamento. En todos los pacientes, las pruebas de laboratorio de rutina permanecieron sin efectos adversos posteriores relacionados con el medicamento. En todos los pacientes, las pruebas de laboratorio de rutina permanecieron sin cambios significativos. La media de la concentración de gastrina sérica ( $\pm$ EEM) se elevó durante el tratamiento inicial con altas dosis de ranitidina ( $126 \pm 23$  pp/mg). En el primer año después del inicio del tratamiento con Pantoprazol, los niveles séricos de gastrina se elevaron hasta 3 veces los valores normales ( $189 \pm 32$  pp/mg). Después de esto, no se observaron elevaciones posteriores en las gastrina sérica por hasta 2.5 años. La densidad de las células enterocromafines (ECL) se incrementó muy ligeramente de 0.19% a 0.24% en un año. Se concluye que el Pantoprazol (40-80 mg/día) es altamente efectivo en la cicatrización de las úlceras pépticas resistentes a ranitidina y que la terapia de mantenimiento a largo plazo con Pantoprazol (40-120mg/día) es bien tolerada. *Aliment Pharmacol Ther* 1994, vol.8 (Suppl.1)



## FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

### AMPLIACION DE SERVICIOS E INAUGURACIÓN

Recientemente en la Facultad se inauguraron dos nuevos proyectos que son de gran beneficio para los estudiantes y profesores de la facultad, y que están siendo promocionados para ampliar el servicio a los profesionales del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala.

### CENTRO DE DOCUMENTACIÓN Y BIBLIOTECA DE FARMACIA - CEDOBF-

Ubicado en el tercer nivel del edificio T-11 de la Ciudad Universitaria, es una unidad de información especializada, que realiza las funciones de selección, adquisición, análisis, almacenaje, recuperación y disseminación de la información científica y tecnológica.

### ESTANTERIA ABIERTA

A partir de abril de 1995 se implementó el sistema de estantería abierta, adquiriendo el sistema electrónico de seguridad, lo que permite al usuario ingresar directamente a las colecciones, a

seleccionar el material bibliográfico pertinente a sus necesidades. En esa misma fecha se implementó el servicio de búsqueda automatizada, que cuenta con 4 computadoras, un servidor y tres terminales.

### CUBICULOS PARA INVESTIGACIÓN

Se construyeron cuatro cubículos para investigación, en los cuales previa reservación, puede trabajarse privadamente.

### REDES DE INFORMACION

Actualmente se presta servicio de búsqueda y recuperación de información, en las bases de datos siguientes: LILACS, RIBLACS, CEDIA, RIBRE, E-ESTADISTICA DE FAO, CEDOBF

### CENTRO ESTUDIANTIL DE COMPUTO -CEC-

Ubicado en las instalaciones del Centro de Documentación y Biblioteca CEDOBF, fue creado como una unidad al servicio de estudiantes y docentes de la Facultad, destinado al uso de computadoras para

trabajos personales (informes, reportes, protocolos e informes finales de tesis y otros) así como a la impartición de cursos sobre el uso de programas de computación, y entre sus objetivos se encuentra el de impulsar el uso de computadoras a nivel estudiantil y docente.

El CEC cuenta con 10 computadoras terminales conectadas en red con el sistema Novell 3.12 a una computadora servidora y cuatro impresoras.

El horario de atención es de lunes a viernes de 10:00 a 17:00 hrs. y los sábados de 8:00 a 12:00 hrs.

Estos dos servicios se encuentran abiertos todos los días sábado, plan iniciado en julio de 1995.

Así mismo se presta el servicio de fotocopias en dichas instalaciones.

Atentamente,

*Lic. Jorge R. Pérez Folgar*