

Artículo original

# Actividad anti-inflamatoria del extracto alcohólico de *Astronium graveolens* Jacq.

Anti-inflammatory activity of the alcoholic extract of *Astronium graveolens* Jacq.

Hernández Bastidas Vanessa<sup>1</sup>, Mora Vivas Flor D<sup>1</sup>, Nicola Malafronte<sup>2</sup>, Nunziatina De Tommasi<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida CP 5101, República Bolivariana de Venezuela. <sup>2</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Salerno, Fisciano CP 84084, Italia.

Recibido: junio de 2017 – Aceptado: octubre de 2017

## RESUMEN

Este trabajo presenta la investigación de la actividad antiinflamatoria del extracto de las hojas secas de *Astronium graveolens* Jacq. utilizando la prueba de edema inducido por carragenina intraplantar en ratas albinas. El incremento promedio del volumen de la pata, así como el % de inhibición de este volumen fue medido. El extracto etanólico redujo el incremento del volumen plantar 4 horas post-carragenina de una manera significativa ( $P < 0,02$ ). La  $CI_{50}$  del extracto fue 5 mg/Kg y el porcentaje de inhibición fue de 57% a la dosis de 100 mg/kg de peso. Por lo que se determina que el extracto etanólico mostró efecto antiinflamatorio en una forma dependiente de la dosis cuando se comparó con el control Ketoprofeno (10 mg/kg). En consecuencia, nuestra investigación sugiere que *Astronium graveolens* Jacq representa un potencial tratamiento en condiciones asociadas con la inflamación.

## PALABRAS CLAVE

Anacardiaceae, *Astronium graveolens* Jacq, anti-inflamatorio, carragenina.

## ABSTRACT

This research shows the investigation of the anti-inflammatory activity of the ethanol extract of dried leaves of *Astronium graveolens* Jacq. The carrageenan-induced hind paw edema in albino rats and the mean increase in paw volume and % inhibition in paw volume were measured. The ethanol extract showed significant reduction 4h post-carrageenan-induced paw edema ( $P < 0.02$ ).  $IC_{50}$  was calculated in 5 mg/Kg and the inhibition percentage was 57% at the dose of 100mg/Kg of body weight. The ethanol extract showed anti-inflammatory effect in dose dependent manner when compared with the control and standard drug, Ketoprofen (10mg/kg). Thus, our investigation suggests a potential benefit of *Astronium graveolens* Jacq in treating conditions associated with inflammation.

## KEY WORDS

Anacardiaceae, *Astronium graveolens* Jacq, anti-inflammatory, carrageenan.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas de la familia Anacardiaceae producen gran variedad de metabolitos secundarios que son de interés tanto desde el punto de vista ecológico como farmacológico [1]. De esta familia se han encontrado en Venezuela algunos géneros de importancia biológica, tales como: *Anacardium*, *Astronium*, *Camptosperma*, *Cyrtocarpa*, *Loxopterigium*, *Mangifera*, *Mauria*, *Ochoterenaea*, *Spondias*, *Tapirira*, *Thyrsodium* y *Toxicodendron* [2]. Estudios de la composición química de especies de estos géneros reportan la presencia de flavonoides, terpenos, esteroides, ácidos fenólicos, saponinas, taninos, xantonas y principalmente lípidos fenólicos y sus derivados [3, 4].

La especie *Astronium urundeuva* ha sido la más estudiada de este género. Entre los compuestos aislados a partir de esta especie se encuentran: compuestos fenólicos, flavonoides como luteolina, derivados cinámicos, proantocianidinas, taninos hidrolizables y leucoantocianidinas [5, 6]. Es conocido que muchos compuestos que poseen este tipo de estructura química han exhibido potencial antiinflamatorio. Un estudio mostró que una fracción de acetato de etilo de la corteza de *A. urundeuva* posee actividad analgésica y anti-inflamatoria. Se observó que la fracción inhibió las contracciones abdominales inducidas por ácido acético en ratones. Así mismo, en la evaluación de la prueba de la formalina, esta fracción a la dosis de 5 y 10 mg/kg peso fue más efectiva por administración intraperitoneal e inhibió predominantemente la segunda fase de respuesta inflamatoria. Dicha fracción (10 y 20 mg/kg), también incrementó el tiempo de reacción a los estímulos térmicos en la prueba de la placa caliente en ratones. En la prueba del edema inducido por carragenina en ratones, la fracción (20 y 40 mg/kg) disminuyó de forma significativa, el edema plantar inducido por la carragenina significativamente

luego de la administración entre 2-4 horas de la carragenina. También fue activa por vía oral (40 mg/kg) durante el mismo período de tiempo [7].

La especie *Astronium graveolens* Jacq, está distribuida en Venezuela en los estados Anzoátegui, Bolívar, Cojedes, Amacuro, Falcón, Guárico, Lara, Miranda, Yaracuy y Zulia [8], también ha sido fuente de compuestos como: lupeol, derivados del ácido quínico, ácido-3-*O*-cafeoilquínico y ácido-5-sinapoiquínico, flavononas glicosiladas, quercetin-3-*O*-glucosido y quercetin- 3-*O*-ramnósido y un tanino hidrolizable, 1,2,3,4,6-penta- *O*-galloil-D-glucopiranos (PGG) [9]. De acuerdo con las referencias consultadas, no existen reportes previos de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *A. graveolens*, de allí la importancia de este estudio.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Material botánico: Las partes aéreas de *A. graveolens* fueron recolectadas en Diciembre 2008 en la Estación Experimental Caparo (7° 28'13''N; 71° 03'16''O), en los Llanos Occidentales, Suroeste del Estado Barinas, Municipio Ezequiel Zamora, a una altitud de 147 m.s.n.m. Del material vegetal se escogió una muestra testigo (Voucher Specimen), la cual se depositó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela). La especie fue identificada por el Profesor Dr. Pablo Meléndez como *Astronium graveolens* Jacq y la misma fue rotulada con el número código FM 031.

Obtención del extracto crudo: Un total de 500 g de material seco y molido proveniente de las partes aéreas de *A. graveolens*, se maceró con etanol (EtOH) a temperatura ambiente por tres días. Transcurrido el tiempo establecido, se separó el extracto etanólico del material vegetal insoluble mediante filtración por gravedad. El solvente se eliminó aplicando la técnica de destilación a presión reducida bajo temperaturas que oscilaron entre 40 y 50°C. El peso del extracto etanólico crudo y seco fue de 15 g.

Ratas. Se usaron ratas Sprague-Dawley, con previa autorización del comité de bioética (Bioterio Facultad de Veterinaria, Universidad del Zulia), entre 150-300 g de peso, de ambos sexos, alimentadas ad libitum.

Suspensión de carragenina. Se preparó una suspensión de carragenina al 1 % (en solución salina fisiológica 0,9 % NaCl) justo antes de la inyección.

Control positivo. Se utilizó como control positivo una solución de ketoprofeno en NaCl 0,9% a un volumen de 0,1 mL.

Extracto seco. El extracto seco se disolvió en una solución de Tween 80 al 2 % en NaCl 0,9 % (solución vehículo), bajo agitación a 40 °C. La excepción fue la dosis para 100 mg/kg que requirió Tween 80 al 80 %.

Bioensayo. Se utilizaron de 4 a 6 animales por cada grupo (controles o tratados). Al grupo de tratamiento se le inyectó 0,1

mL de la suspensión de carragenina 1% en la superficie plantar de la pata derecha trasera de la rata con una aguja 26-27 G, previa asepsia del área. En la pata izquierda se inyectó solo el vehículo del utilizado para disolver los compuestos, como control interno del efecto expansivo mecánico no inflamatorio de los volúmenes de líquido inyectado. Volúmenes de 0,1 mL de ketoprofeno y solución del extracto vegetal fueron inyectadas intramuscularmente (i.m) 30 min antes de la inyección de carragenina. Los animales grupo controles recibieron un volumen equivalente de vehículo: (a) solución de NaCl al 0,9% i.m (controles para comprar con el ketoprofeno) o (b) solución Tween 80 al 2% (controles para comparar con el extracto). Los cambios de volumen de la pata fueron medidos por un pletismómetro electrónico (Ugo, Basili, Italia) antes de cualquier inyección y luego a las 0, 0,5, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección intraplantar de carragenina tal como es descrito por Monteiro y colaboradores [10].

## **ANÁLISIS DE DATOS**

Las dosis inhibitorias 50 (DI50) fueron calculadas gráficamente con Prism Graphpad estableciendo un punto de corte en la curva dosis-respuesta a nivel del 50% de la máxima inhibición o efecto máximo (estimado sobre el eje de las Y), y luego extrapolándolo dosis correspondiente (estimado sobre el eje de las X), independientemente de su significancia estadística. El efecto máximo (Emax) fue el porcentaje más alto de reducción en el volumen de la inflamación plantar alcanzado dentro del rango de dosis evaluado en el presente estudio, en comparación con el volumen plantar máximo promedio observado en los animales controles (es decir, aquellos tratados solo con el vehículo correspondiente a cada compuesto evaluado), y alcanzado a las 4 horas después de la inyección del agente flogístico (carragenina).

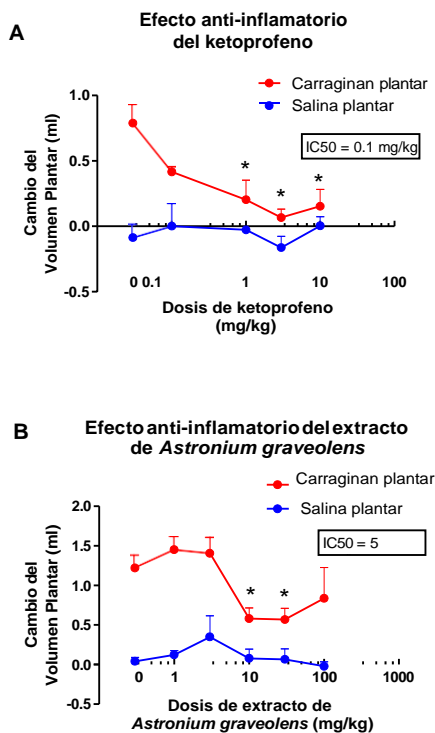
Los resultados fueron expresados como promedios  $\pm$  error estándar del promedio. Se utilizaron estadísticas paramétricas para analizar la significancia de las diferencias entre promedios ya que los datos presentaron predominantemente una distribución normal según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. De esta manera, para analizar diferencias entre dos promedios se utilizó la prueba t de student. Las diferencias entre una o dos curvas dosis-respuesta y una o dos curvas efecto-curso temporal se evaluaron con ANOVA de una o dos vías, respectivamente, seguido por la post-prueba de Bonferroni. Se consideró que una diferencia era estadísticamente significativa a un valor  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

La sensibilidad discriminatoria de la prueba de edema inducido por carragenina intraplantar fue evaluada mediante una curva dosis-respuesta para el extracto de *A. graveolens*. Este test del edema inducido por carragenina es el más frecuentemente usado como modelo experimental de inflamación aguda para determinar el potencial antiinflamatorio de productos naturales [10, 11, 12].

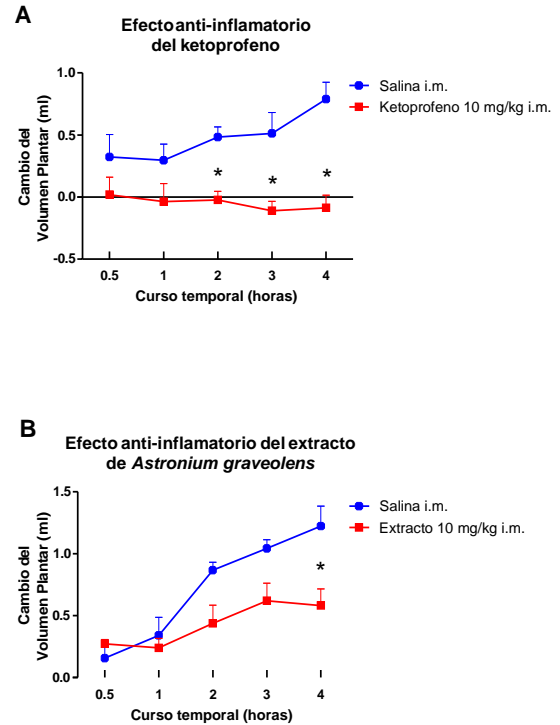
Se ensayó la respuesta anti-inflamatoria del reconocido fármaco ketoprofeno como fármaco de referencia o

control positivo. En la Figura 1A se muestra que este fármaco redujo el incremento del volumen plantar 4 horas post-carragenina, en una forma dependiente de la dosis, lográndose el 50% del efecto máximo del ketoprofeno a 0,1 mg/kg i.m. (dosis inhibitoria 50%-CI). El ANOVA de dos vías demostró que el efecto inhibitorio fue estadísticamente significativo a las dosis de 1,3 y 10 mg/kg respecto al cambio de volumen plantar del grupo control (dosis 0 mg/kg – solo vehículo) ( $p < 0,05$ ). En la Figura 1B se observa que el extracto de *A. graveolens* redujo el incremento del volumen plantar 4 horas post-carragenina, en una forma dependiente de la dosis; la  $CI_{50}$  del extracto fue 5 mg/kg. El ANOVA de una vía demostró que el efecto inhibitorio fue estadísticamente significativo a las dosis de 10 y 30 mg/kg respecto al cambio de volumen plantar del grupo control (dosis 0 mg/kg).



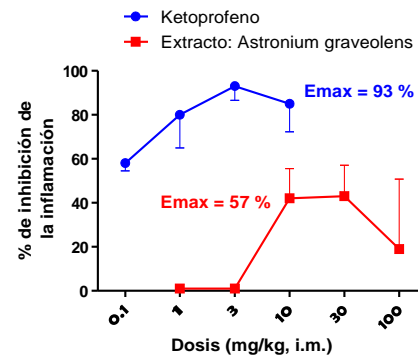
**Fig. 1.** Curvas dosis-respuestas del efecto anti-inflamatorio del Ketoprofeno y del extracto de *A. graveolens*. Dosis 0 mg/kg corresponde a los controles respectivos (animales tratados con el vehículo del compuesto evaluado). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa respecto al valor promedio observado en el animal control correspondiente (salina, i.m.) ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, en la figura 2 se observa el curso de la respuesta inflamatoria de las patas derechas de las ratas tratadas con carragenina, hasta 4 horas. Estas ratas fueron tratadas con una dosis intramuscular de 10 mg/kg (eficacia anti-inflamatoria demostrada) tanto de ketoprofeno [11] como del extracto de *A. graveolens*. Se puede ver que la diferencia máxima entre ambos grupos va aumentando con el tiempo hasta alcanzar un máximo a las 4 horas, final del seguimiento observacional.



**Fig. 2.** Curso temporal de las respuestas anti-inflamatorias en las patas inyectadas con carragenina en ratas tratadas con ketoprofeno o extracto de *A. graveolens*. El curso temporal muestra el tiempo transcurrido después de la inyección del agente flogístico (carragenina). Los asteriscos indican una diferencia estadísticamente significativa respecto al valor promedio observado en el animal control correspondiente (salina, i.m.) ( $p < 0,05$ ).

Por último, en la Figura 3 se representan los datos en porcentaje de inhibición con relación al control (dosis 0 mg/kg). Como se puede ver, el efecto máximo del ketoprofeno (93% de inhibición de la inflamación) se comenzó a observar a la dosis de 3 mg/Kg mientras que el efecto máximo del extracto vegetal fue menor (57%), y se comenzó a observarse a una dosis mayor, 10 mg/Kg. Es decir, el extracto presenta una menor eficacia anti-inflamatoria que el ketoprofeno.



**Fig. 3.** Curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición del incremento del volumen plantar 4 horas siguientes a la inyección de carragenina en animales tratados con dosis crecientes de ketoprofeno o extracto de *A. graveolens*.  $E_{max}$ : Efecto máximo del tratamiento, es decir, % reducción de la inflamación en relación a la inflamación máxima posible observada en los animales controles respectivos.

## **DISCUSIÓN**

Diversos estudios científicos demuestran el potencial antiinflamatorio de extractos de especies vegetales. Para el extracto alcohólico de *A. graveolens* se ha reportado tanto potencial antiangiogénico como antioxidante *in vitro* [9]. Sin embargo, no existen reportes sobre su actividad antiinflamatoria. Es por ello, que este estudio fue diseñado para evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto alcohólico de *A. graveolens* en ratas.

La sensibilidad discriminativa de la prueba de edema inducido por carragenina intraplantar, ha sido determinada para extractos de otras especies vegetales arrojando resultados similares a los obtenidos para el extracto de *A. graveolens* [12, 13].

Los extractos acuoso, metanólico y etanólico de *Ruta graveolens* fueron evaluados a través de la prueba de edema inducido por carragenina. Los extractos se ensayaron a dos dosis diferentes. Los resultados mostraron que el extracto metanólico con una dosis de 20 mg/kg y el extracto etanólico con una concentración de 50 mg/kg mostraron un porcentaje de 90,9% de inhibición [12].

Por otra parte, otro estudio reporta la actividad antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli*, donde, el extracto de diclorometano produce a las 3 h un efecto anti-inflamatorio estadísticamente significativo que corresponde a un 51% de inhibición con respecto al grupo control [13]. Si se comparan los resultados obtenidos para el extracto de *A. graveolens* con los reportados en la literatura, se puede observar, que el extracto de *A. graveolens* fue ensayado a una dosis por debajo (10 mg/kg) de la utilizada en los otros dos estudios, alcanzando un porcentaje de reducción del edema plantar significativo, lo que se traduce en que, el extracto de *A. graveolens* muestra una actividad anti-inflamatoria similar a dosis más bajas que la de los extractos vegetales comparados.

La reacción inflamatoria está orquestada por una amplia gama de mediadores capaces de promover eventos vasculares, reclutar células al sitio de la inflamación y posteriormente resolver el proceso. La literatura ha proporcionado pruebas que demuestran una vasta gama de mediadores inflamatorios (incluyendo prostaglandinas (PGs), cininas, factor activador de plaquetas, leucotrienos (LTs), aminas, purinas, citoquinas, moléculas de adhesión y quimiocinas) que actúan en sitios específicos (por ejemplo, la microvasculatura), provocando cambios en el tono vascular y en el flujo sanguíneo y la activación local de leucocitos y células endoteliales [14].

La inflamación producida por carragenina se atribuye a la liberación de varios mediadores y se han descrito dos fases. La fase inicial debida a la liberación de histamina, serotonina y citoquinas, en la primera hora luego de aplicada la inyección de carragenina. La segunda fase es atribuida a la liberación de bradiquinas, proteasas, prostaglandinas y lisosomas. La última fase es la más sensible a la mayoría de los agentes antiinflamatorios y allí se podría incluir la actividad del extracto de *A. graveolens* [13].

La actividad antiinflamatoria determinada en este estudio está relacionada con la presencia de compuestos como el lupeol, el ácido clorogénico, el quercetin-3-*O*-glucosido y la quercetin-3-*O*-rhamnosida compuestos aislados de *A. graveolens* [9]. Al lupeol, diversos estudios le atribuyen un

alto potencial antiinflamatorio, dirigido a las vías moleculares que implican el factor nuclear kappa B (NF κB), cFLIP, Fas; Kras y células tipo fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3 K)/Akt y Wnt/β-catenina [14]. Es de destacar que el lupeol en sus dosis terapéuticas efectivas no exhibe toxicidad a las células y tejidos normales [15]. Por otra parte, se presume que los derivados del ácido clorogénico (ácido-3-*O*-cafeoilquinico y el ácido-5-sinapoiquinico), también presentes en la especie [9]; pudieran ser potenciadores de dicha actividad; datos de la bibliografía muestran que los polifenoles presentan actividad antiinflamatoria, antioxidante y anti carcinogénica como sus principales características biológicas. Se ha reportado que el ácido clorogénico presenta actividad anti-edematogénica y antinoceptiva en modelos de animales de inflamación inducida por carragenina y dolor inducido. Dichas actividades son derivadas de la acción inhibitoria del ácido clorogénico de los mediadores de la inflamación involucrados en estas respuestas [16]. La actividad antiinflamatoria y de barrido de radicales de flavonoides como la quercetin-3-*O*-glucosido y la quercetin-3-*O*-rhamnosida, ha sido ampliamente demostrada [17].

## **CONCLUSIONES**

La sensibilidad discriminativa de la prueba de edema inducido por carragenina intraplantar fue evaluada mediante una curva dosis-respuesta para el extracto de *A. graveolens*. El extracto redujo el incremento del volumen plantar 4 horas post-carragenina, en una forma dependiente de la dosis; la  $CI_{50}$  del extracto fue 5 mg/Kg y el porcentaje de inhibición fue de 57%.

En conclusión, el extracto de *A. graveolens* posee actividad antiinflamatoria la cual está relacionada con los compuestos aislados previamente de esta especie vegetal. Este descubrimiento sugiere la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos, partir de esta especie, con potencial uso clínico como antiinflamatorios.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CDCHTA, ULA, por la aprobación del proyecto código: FA-538-13-08-B.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Veillon, J. Especies forestales autóctonas de los bosques naturales de Venezuela. 2da ed. Mérida: Inst. Forest. Latinoamericano; 1994.
- [2] Huber O, Duno R, Riina F, Stauffer L, Pappaterra F, Jiménez L, Llamozas A, Osiris G. Estado actual del conocimiento de la flora venezolana. Caracas. Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales Renovables; 1998.
- [3] Mitchell J. Anacardiaceae. Flowering Plants of the Neotropics. New Jersey: Princeton University Press; 2004.
- [4] Pell S. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). Louisiana. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2004.
- [5] Viana G, Bandeira M, Matos F. Analgesic and

antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemao. Phytomedicine. 2003; 10(2-3): 189-195.

[6] Nobre H, Oliveira R, Maia F, Nogueira M, Moraes M, Bandeira M, Andrade G, Viana G. Neuroprotective Effects of Chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced Cytotoxicity in Rat Mesencephalic Cells. Neurochem Res. 2008; 34(6): 1066-1075.

[7] Viana G, Bandeira M, Matos F. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemao. Phytomedicine. 2003; 10(2-3): 189-195.

[8] Williams J, León H. Estudio anatómico del xilema secundario de 17 especies de la familia Anacardiaceae en Venezuela. Acta Botánica Venezolana. 2003; 26, s/p.

[9] Hernández V, Malafronte N, Mora F, Pesca S, Aquino R, Mencherini T. Antioxidant and antiangiogenic of *Astronium graveolens* Jacq. Leaves. Nat Prod Res. 2014; 28(12): 917-922.

[10] Monteiro M, Rocha A, Medeiros L, Maia S, Sousa D. Topical antiinflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Gham. Leaves. J. Ethnopharmacol. 2007(2); 111: 378-382.

[11] Winter C, Riselay E, Nuss G. Carrageenan induced oedema in the hind paw of the rats as an assay for anti – inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1962; 111:544-547.

[12] Ratheesh M, Helen A. Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6 (10): 1209-1211.

[13] Miño J, Gorzalczany V, Moscatelli G, Ferraro C, Acevedo, Hnatyszyn. Actividad antinoceptiva y antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. (“Ceibo”). Acta Farm Bonaer. 2002; 21(2): 93-98.

[14] Calixto J, Otuki M, Santos A. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor KB (NF-KB). Planta Med. 2003; 69(11): 973-983.

[15] Saleem M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. Cancer Lett. 2009; 285(2): 109-115.

[16] Dos Santos M, Almeida M, Lopes N, Petto De Souza G. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. Biol Pharm Bull. 2006; 29(11): 2236-2240.

[17] Odontuya G, Hoult J, Houghton P. Structure-Activity Relationship for Antiinflammatory Effect of Luteolin and its -Derived Glycosides. Phytother. Res. 2005; 19(9): 782-786.