

Efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* e ratas.

Antiinflammatory effect of the methanolic extract of *Erythroxylum coca* leaves in rats.

O efeito antiinflamatório do extracto de metanol das folhas de *Erythroxylum coca* em ratos.

César Braulio Cisneros Hilario¹, David Fernando Cisneros Hilario¹, Keith Luger, Carrillo Julca¹, Jorge Luís Arroyo Acevedo²

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la influencia del extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* sobre el edema subplantar y auricular inducido con carragenina y Xylol en ratas respectivamente. El estudio es experimental y se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, para lo cual se utilizaron 30 ratas albinas cepa Holtzman machos dispuesta de manera aleatoria en 6 grupos, de 5 ratas cada uno. Todos los grupos recibieron carragenina 0.1 ml al 1% inyectada en la aponeurosis subplantar y 20 µg de xylol por vía tópica del lóbulo auricular, el 1° grupo fue control y recibió SSF, el 2° diclofenaco 50 mg/kg, 3° dexametasona 4 mg/kg, 4°, 5° y 6° grupo recibieron extracto en dosis de 50, 250 y 500 mg/Kg por vía oral respectivamente, para luego medir el edema subplantar usando un pletismómetro digital a 1h, 3h y 6h además de extraerles una porción circular del lóbulo auricular con un sacabocados y ser pesados, Para la significancia estadística se consideró la $p < 0,05$. Las principales medidas de resultado fueron la disminución del edema subplantar y auricular inducida en ratas. Los resultados evidencian un mayor efecto antiinflamatorio en los grupos que recibieron el extracto etanólico, a dosis de 250 mg/kg para edema subplantar y 50 mg/kg para edema auricular. Concluyéndose que el extracto metanólico de hojas de *Erythroxylum coca* en condiciones experimentales presentan efecto antiinflamatorio en ratas.

Palabras clave: Antiinflamatorio, extracto metanólico, *Erythroxylum coca*, carragenina, xylol.

Abstract

The present investigation had as objective to determine the influence of the methanolic extract of the leaves of *Erythroxylum coca* on the subplant and auricular edema induced with carrageenan and Xylol in rats respectively. The study is experimental and was developed in the laboratories of the Faculty of Human Medicine of the University San Pedro, for which 30 male albino rats will be used Holtzman male strain arranged randomly in 6 groups, 5 rats each. All groups received carrageenan 0.1 ml 1% injected into the subplantar aponeurosis and 20 µg xylol topically at the earlobe, the 1st group was control and received SSF, the 2nd diclofenac 50 mg / kg, the 3rd dexamethasone 4 mg /kg, 4°, 5° and 6° group received extract at doses of 50, 250 and 500 mg/kg orally respectively, to then measure the subplantar edema using a digital plethysmometer at 1h, 3h and 6h in addition to extracting them A circular portion of the auricular lobe with a punch and be weighed. For $p < 0.05$, statistical significance was considered. The main outcome measures were the reduction of subplantar and atrial edema induced in rats. The results showed a greater anti-inflammatory effect in the groups that received the ethanolic extract, at doses of 250 mg/kg for subplantar edema and 50 mg/kg for atrial edema. Concluding that the methanolic extract of leaves of *Erythroxylum coca* under experimental conditions present anti - inflammatory effect in rats.

Keywords: Antiinflammatory, methanolic extract, *Erythroxylum coca*, carrageenan, xylol.

Resumo

A presente investigação tem como objectivo determinar a influência do extracto metanólico das folhas de

¹Universidad San Pedro. Facultad de Medicina. Chimbote, Perú. cbraulio_cisnerosh@hotmail.com

²UNMSM, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones clínicas, Lima-Perú.

Recibido, 17 de febrero de 2017
Aceptado, 15 de noviembre de 2017

Erythroxylum coca no subplant e edema do ouvido induzido por carragenina e com xilol em ratos, respectivamente. O estudo é experimental e foi desenvolvido nos laboratórios da Faculdade de Medicina Humana da Universidade de San Pedro, por 30 ratos machos albinos que será utilizado estirpe masculina Holtzman dispostas aleatoriamente em seis grupos, cinco ratos cada. Todos os grupos receberam 0,1 ml de carragenano 1% injectado no aponeurose subplantar e 20 g xilol topicamente na orelha, o primeiro grupo de controlo e foi recebido SSF, a 2 de diclofenac de 50 mg / kg, 3 a dexametasona 4 mg / kg, 4, 5 e 6 receberam extracto grupo em doses de 50, 250 e 500 mg / kg por via oral, respectivamente, para, em seguida, uma medida do edema subplantar usando um pletismómetro digital em 1h, 3h 6h e além de extrair deles porção do lóbulo auricular circulante com um soco e ser pesado. Para $p < 0,05$, a significância estatística foi considerada. Os principais desfechos foram a redução do edema subplantar e atrial induzida em ratos. Os resultados mostraram um maior efeito anti-inflamatório nos grupos receberam o extracto etanólico que, em doses de 250 mg / kg para o edema subplantar e 50 mg / kg para o edema auricular. Concluindo que o extrato metanólico de folhas de *Erythroxylum coca* em condições experimentais presente efeito anti-inflamatório em ratos.

Palavras-chave: antiinflamatório, extrato metanólico, *Erythroxylum coca*, carragena, xilol.

Introducción

La inflamación involucra una serie de respuestas, como reparadoras, protectoras frente a injurias tisulares, producidas por infecciones, procesos inmunológicos o injurias traumáticas directas. Los vegetales contienen compuestos fenólicos y flavónicos, los cuales son pigmentos naturales y que protegen al organismo humano del daño producido por agentes oxidantes; están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Aherne, 2002).

El *Erythroxylum coca* (coca), es una planta nativa del Perú, de valles calientes y húmedos de la cordillera de los andes, que crece a 600 y 2000 msnm, que ha sido cultivada desde tiempos muy remotos (2100 AC aprox.) (Villar, 2001) cuyas hojas son utilizadas por los habitantes de la zona por sus diversas propiedades terapéuticas y entre ellas las antiinflamatorias. (Raj, 2001)

En la base de datos Index Kewensis Detailed Report (1998), aparece en el año 1759 el dato más antiguo de una especie de *Erythroxylum*. De este género se informan 235 especies en la familia *Erythroxylaceae* y 134 especies en la familia *Linaceae*; esto suma un total de 369 especies de *Erythroxylum* en el mundo. De acuerdo al Chemicals Abstracts Data Base (1987-2002), Med-Line (1980-2003), NAPRALERT (1975-2003) y varios artículos originales consultados, se denota que es un género pocamente estudiado tanto química como farmacológicamente.

Para este género se señalan el aislamiento de alcaloides y flavonoides como grupos químicos fundamentales, mientras que las hojas y el tronco son las partes más estudiadas de las plantas. Entre las propiedades etnomédicas se destacan fundamentalmente el uso como estimulante, para la inducción de euforia y aliviar la sensación del hambre, contra la fatiga y problemas estomacales. Desde el punto de vista biológico se han estudiado extractos de varias de las especies del género; para ello se han desarrollado ensayos para evaluar el efecto citotóxico, la actividad antibacteriana y la actividad antiviral, entre otras (Lohezic, 1999).

Los usos del género *Erythroxylum* se han extendido a diversas regiones del mundo, donde se detalla la utilización etnomédica de al menos 15 especies del género, distribuidas en diversas regiones del mundo, que cubren 12 países. Las diferentes especies se han utilizado para el tratamiento de alrededor de 40 trastornos clínicos. Las principales propiedades etnomédicas atribuidas a este género son: estimulante (12,6%), para la

inducción de euforia (10,8%) y contra la fatiga (10,8%), el alivio de la sensación del hambre (10,8%), problemas estomacales (4,5%), cefaleas y dolor de garganta (3,6%). También las especies de este género se han utilizado contra la fiebre, los desórdenes hepáticos y renales, como anestésico local, afrodisíaco, antihemorrágico, antiinflamatorio, cicatrizante, entre otras. El uso etnomédico de este género se registra fundamentalmente para países de Sudamérica, lo que representa el 32% de la información total. La República de Perú se destaca por una mayor práctica etnomédica con un porcentaje de mención de 23,4% respecto al total de los registros de la literatura; le siguen Ecuador con un 10%, Colombia con un 8% y Brasil con un 7,2%. Los órganos vegetales más utilizados en la medicina tradicional son las hojas secas, que constituyen el 72% del total de lo que aparece registrado; las hojas frescas, que constituyen el 15 %; el conjunto de hojas y ramas (3%); las frutas frescas (2%); las raíces secas (2%) y en menor frecuencia, aparece registrado el uso de la madera del tronco y el material seco de la corteza, las ramas y los frutos. Por otro lado, existe mención del uso como alimento de algunas de estas especies (PRALERT, 2003)

Las especies que se han estudiado científicamente con mayor frecuencia son *Erythroxylum coca* (20%), *E. coca* var. *coca* (16%), *E. coca*, var. *ipadu* (14%), *E. novogratense* (15%) y *E. novogratense* var. *truxillensis* (11%). De manera general, se puede afirmar que el método de extracción más utilizado fue aquel que emplea el agua caliente, es decir, los métodos tradicionales de infusión y decocción (Prieto, 2002).

Por todas estas razones nos planteamos el problema si: ¿El extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* tendrá efecto antiinflamatorio al administrarlo por vía oral en ratas con inducción de inflamación en el nódulo subplantar con carragenina y lóbulo auricular con xylol?, planteándonos la hipótesis de que el extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* tiene efecto antiinflamatorio en ratas con inducción de inflamación en el nódulo pedal con carragenina y lóbulo auricular con xylol cuando es administrado por vía oral.

Siendo nuestro objetivo general: Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* en ratas; y los específicos: Inducir la inflamación en el nódulo subplantar y lóbulo auricular de la rata por carragenina y xylol respectivamente, determinar el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* en la inflamación en el nódulo subplantar en ratas y determinar el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca* en la inflamación en el lóbulo auricular en ratas

Materiales y Métodos

El diseño del estudio es de tipo analítico-experimental, aleatorizado, completo, pre-clínico in vivo; la población estuvo conformada por ratas Albinas Cepa Holtzman del biotério del INS Lima-Chorrillos y la muestra por 30 ratas, además se adquirió 1 kg de hojas de coca micropulverizada (Delisse), distribuida por la empresa nacional de la coca Sociedad Anónima (ENACO). Lima-Perú.

Para la preparación del extracto alcohólico, las hojas de *Erythroxylum coca*. fueron lavadas y sometidas a deshidratación, a 40 °C en un horno con aire circulante, luego el material seco, fue triturado en un molino eléctrico de cuchillas, hasta obtener un polvo fino, y se llevó a maceración con metanol a temperatura ambiente. Luego de 7 días se filtró y dicho filtrado se desecó a 40°C en estufa hasta peso constante. El residuo seco, fue denominado extracto metanólico, el que fue conservado en frasco de color ámbar a

4°C, luego éste residuo sirvió para realizar el estudio fitoquímico y ensayo farmacológico, previa reconstitución con agua destilada, utilizando como agente tensoactivo polisorbato de sodio 80° al 3% de la solución a preparar. (CYTED, 1995).

El estudio fitoquímico del extracto metanólico *Erythroxylum coca* se realizó en los ambientes de laboratorio de farmacología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro, al cual se le practicó, las reacciones de Gelatina, tricloruro férrico, Dragendorff, Shinoda, Para determinar cualitativamente la presencia y cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto, utilizando la siguiente codificación: Ausencia (-), Poca cantidad (+), Regular Cantidad (++), Abundante cantidad (+++). (Lock de Ugaz, 1994).

Se utilizaron 30 ratas albinas cepa Holtzma de 175 ± 25 g de peso corporal. Las cuales procedieron del bioterio del Instituto Nacional de Salud (Lima-Chorrillos), las cuales fueron aclimatadas 7 días antes de la experimentación y fueron alojadas en jaulas metálicas con alimento balanceado en pellets (ratonina) y agua a libertad a temperaturas 25 ± 1 °C, con 12 horas ciclo luz / oscuridad y humedad relativa aproximadamente 60%, luego fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos de cinco ratas cada uno, donde todos recibieron carragenina 0.1 ml al 1% inyectada en la aponeurosis subplantar (Winter, 1962), además de xylol 20 µg aplicada vía tópica en el lóbulo auricular (CYTED, 1995), inmediatamente recibieron los tratamientos siguientes: El grupo 01 recibió SSF 2 mL/Kg, el grupo 02 recibió, diclofenaco 50 mg/kg, el 03 recibió dexametasona 4 mg/kg, mientras que los grupos 04, 05 y 06 recibieron extracto de coca en dosis de 50, 250 y 500 mg /kg respectivamente.

Para la evaluación del efecto antiinflamatorio se tomaron las medidas del volumen del nódulo subplantar de las ratas a 1, 3 y 6 horas, haciendo uso de un pletismómetro digital, mientras que para la evaluación del efecto antiinflamatorio en el lóbulo auricular se anestesió a las ratas haciendo uso de una cámara de vidrio conteniendo éter y se procedió a retirarles una porción circular del lóbulo auricular haciendo uso de un sacabocados, para luego ser pesadas en una balanza digital.

Los datos fueron expresados mediante la estadística descriptiva utilizándose valores medios \pm error estándar(EA), límites inferior y superior a un intervalo de confianza del 95%, e inferencialmente por el análisis de varianza y de comparaciones múltiples de Duncan; los valores fueron significativos con una $p < 0,05$; para el cual se utilizó el programa estadístico SPSS.V24.

Resultados

Tabla 1. Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Erythroxylum coca*.

Reacción de Identificación	Metabolito Secundario	Cantidad
Tricloruro férrico	Compuestos Fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++
Shinoda	Flavonoides	+++

Leyenda: (+++) = Abundante cantidad; (++)=Regular cantidad o positivo, (+)= Poca cantidad o trazas: (-)=Ausencia.

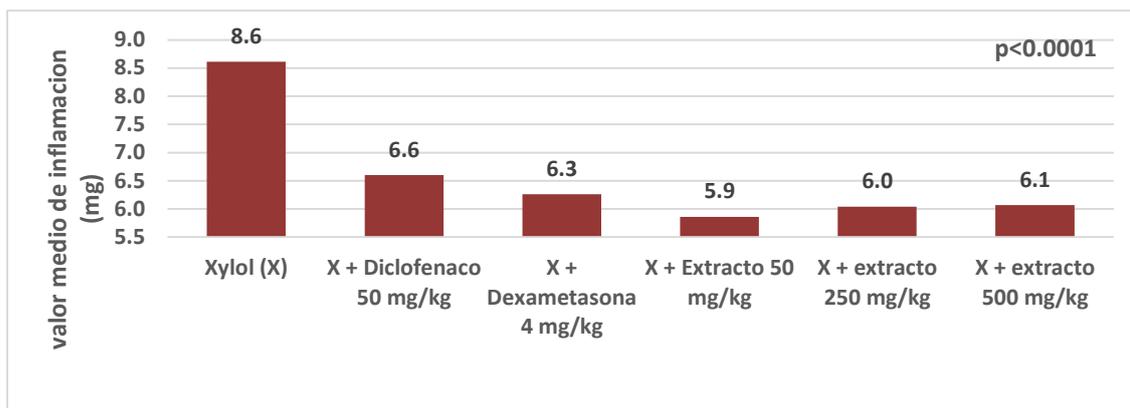


Figura N° 01. Valor medio de la masa de los discos auriculares al evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *Eritroxylum coca* sobre el edema auricular inducido por xylol en ratas.

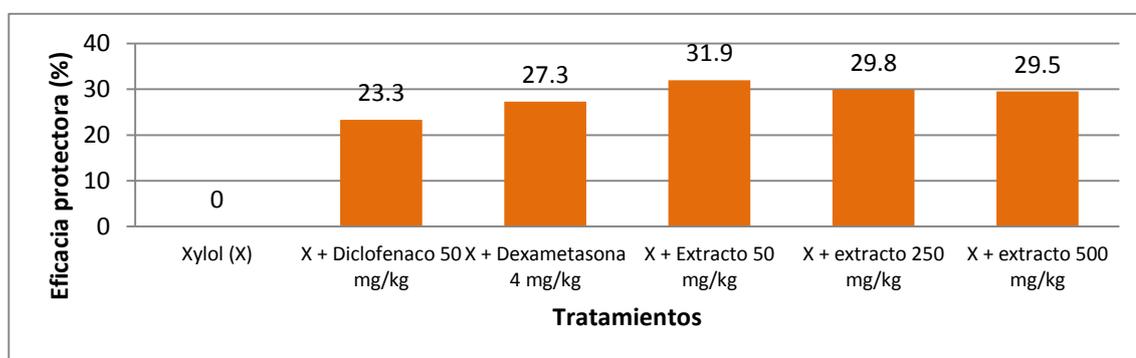


Figura N° 02. Porcentaje de eficacia antiinflamatoria del extracto metanólico de *Erythroxyllum coca* sobre el edema auricular inducido por xylol en ratas.

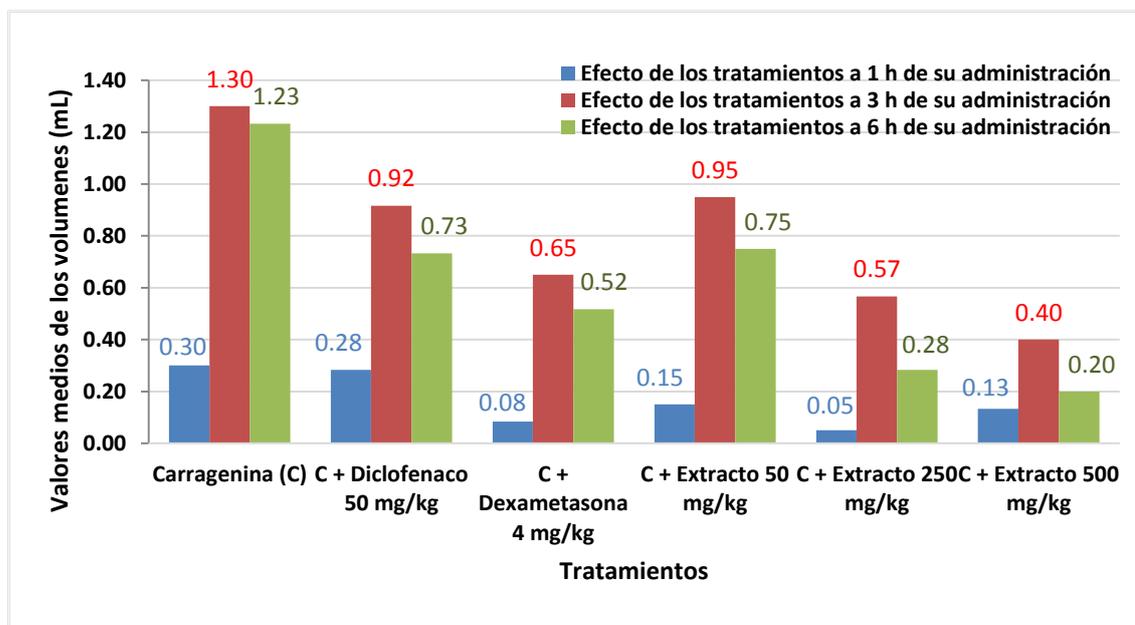


Figura N° 03. Gráfico comparativo de los valores medios de los volúmenes (mL) del nódulo subplantar de las ratas al evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de *Erythroxyllum coca*, después de 1 h, 3 h y 6 h de tratamientos.

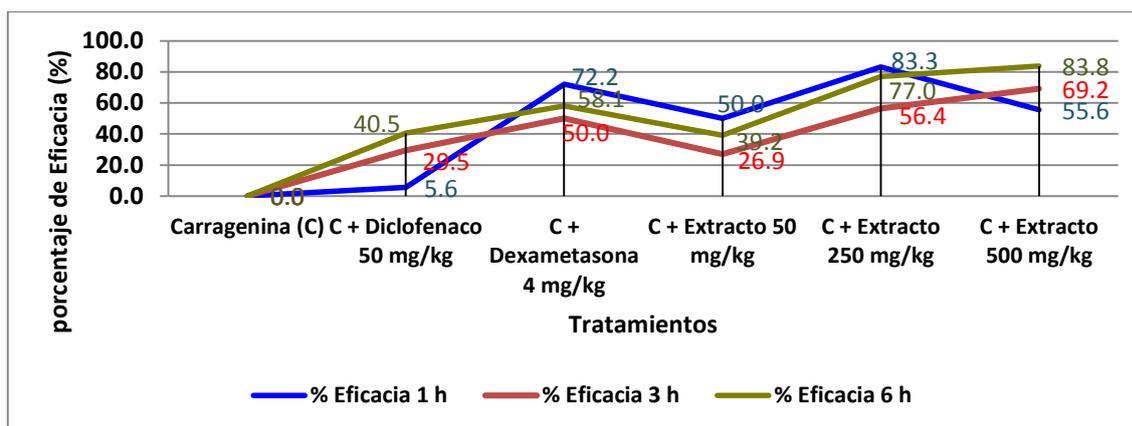


Figura N° 04. Porcentaje de eficacia antiinflamatoria del extracto metanólico de *Eritroxylon coca* sobre el edema subplantar inducido por carragenina en ratas.

Discusión

En este trabajo se muestran los resultados del estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de coca evidenció contener una gran cantidad de alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides (Tabla 01). Por otro lado, los flavonoides han mostrado actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo* (Tanaka, 1994). Uno de estos mecanismos es por inhibición de eicosanoides generadores de enzimas, incluyendo fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipoxigenasa, reduciendo así la presencia de prostanoïdes y leucotrienos. Además, recientes estudios muestran que los flavonoides, especialmente flavonas y sus derivados, expresan una gran actividad antiinflamatoria debido a la modulación de la expresión de genes proinflamatorios, tales como ciclooxigenasa-2, óxido nítrico sintasa inducible y varias citoquinas pivotaes (Kim, 2004).

Al evaluar el efecto antiinflamatorio por el método del lóbulo auricular inducido por xylol evidencia que existe un efecto protector del extracto metanólico de la hojas de *Erythroxylum coca* a dosis de 50 mg/Kg frente al agente flogógeno xylol (Figura 01), lo que representa un 31.9% de eficacia antiinflamatoria (Figura 02).

Al evaluar el efecto antiinflamatorio por el método del nódulo subplantar inducido por carragenina, se observa que las tres primeras horas posterior a su administración, produce un comportamiento bifásico, en la primera hora (primera fase), registra un incremento gradual del edema (Figura 03), así mismo durante las tres primeras horas (segunda fase), se caracteriza por un incremento abrupto del edema a partir de los 90 minutos (Vinagar, 1969). Además de observarse mayor efecto antiinflamatorio del extracto de las hojas de coca con un porcentaje de eficacia de 83.3% (250 mg/kg) durante la primera hora, 83.8% (500 mg/kg) durante la tercera hora y 69.2% (500 mg/Kg) durante la sexta hora (Figura 03, 04).

Los flavonoides poseen actividad antiinflamatoria al inhibir diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH) (Middleton, 2000; García, 2002), además los flavonoides polihidroxilados actúan preferentemente por la vía de 5-lipooxigenasa, mientras que los menos hidroxilados inhiben fundamentalmente la vía de ciclooxigenasa. *In vivo* (Ferrándiz, 1990). Otros mecanismos implicados en la acción antiinflamatoria y en los cuales pueden intervenir los flavonoides son: inhibición de la liberación de

histamina, inhibición de la migración celular (en el proceso inflamatorio los leucocitos se dirigen por quimiotactismo hacia el foco inflamatorio, donde son activados liberando eicosanoides y otros agentes proinflamatorios). Muchos de los flavonoides y fenoles cooperan en el efecto antiinflamatorio, pues una explicación posible sería la actividad inhibidora de la prostaglandina sintetasa, impidiendo por lo tanto la síntesis de prostaglandinas, componente responsable de la actividad inflamatoria. (Ferrándiz, 1990).

La IL-1 permite la inducción de genes que codifican para la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la fosfolipasa A tipo 2 (PLAT2) y la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Otras citoquinas, como IL-2, IL-6 e IL-8, contribuyen a la aparición de manifestaciones de respuesta inflamatoria (Goodman y Gilman, 1996). Las consecuencias biológicas de esta inducción se traducen en una franca respuesta inflamatoria. Por otra parte, los corticoides ejercen profundos efectos sobre las reacciones inmunitarias, inhibiendo la producción de interleuquinas IL-1 e IL-6 (Castell, 1989). Explican que la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis del tumor alfa (TNF-alfa) y la interleuquina-6 (IL-6) modulan en la fase aguda de la inflamación la síntesis de proteínas del plasma, en hepatocitos humanos adultos. Solo la IL-6 estimula la síntesis de proteína C reactiva durante la inflamación. Estos datos sugieren que IL-6 tiene el papel crucial en la regulación de síntesis aguda de proteína de fase en los hepatocitos humanos. En resumen, se puede expresar que los flavonoides, al tener un comportamiento dual de inhibir la formación de prostaglandina E2 (PGE2) y leucotrieno B4 (LTB4), afectan el metabolismo del ácido araquidónico e inhiben la síntesis de interleuquina 1 (IL-1) y como consecuencia la interleuquina 6 (IL-6), lo cual a su vez afecta la síntesis de la proteína C reactiva (PCR).

La actividad antiinflamatoria según el modelo de edema auricular y nódulo subplantar en ratas se fundamenta a la posible presencia de las flavonas, *chrysin* y *apigenina* en el extracto metanólico de coca, además de la presencia de flavonoles e isoflavonas (Kim, 2008).

Conclusiones

En condiciones experimentales se ha demostrado que el extracto metanólico de las hojas de *Erythroxylum coca*, posee efecto antiinflamatorio inducido por carragenina y xylol en ratas.

Referencias bibliográficas

- Aherne, S., O'Brien, N. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 18:75-81.
- Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., Heinrich, P.C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*, 242(2):237-9.
- Chemical Abstracts Database (until 2002) on CD and printed version, American Chemical Society, USA.
- CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-I. Búsqueda de principios bioactivos de plantas de la región. Manual de técnicas de investigación; 1995. p.220
- Ferrándiz, M.L., Alcaraz, M.J. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions*, 32:283-8.

- García, L., Rojo, D., García, L.V., Hernández, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. Centro de Investigaciones Biomédicas "Victoria de Girón" *Rev Cubana Invest Biomed*, 21(3):214-6.
- Goodman y Gilman. (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª. Edición. México: Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 1996:661-9.
- Index Kewensis Detailed Report (1998) Base de Datos en CD-ROM, Gran Bretaña.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., Kang, S. S. (2004). Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*. 96:229-45.
- Kim, H.K., Namgoong, S.Y., Kim, H.P. (2008). Anti-inflammatory activity of flavonoids: mouse ear edema inhibition. *Arch Pharmacol Res*, 16(1):18-24.
- Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos de estudios de productos naturales*. 2º Edición. Lima: Fondo Editorial PUCP.
- Lohezic, F; M. Amoros., J. Boustie & L. Girre (1999). *Pharm. Pharmacol. Commun.* **5**: 249-53.
- Middleton, E., Kanndasamy, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52(4):673-751.
- Prieto, S., G. Garrido, J.A. González & J. Molina (2002). *Revista CNIC. Ciencias Biológicas* **33**: 99-116.
- Raj, K., Sripal, M., Chauluvadi, M., Krishna, D. (2001). Bioflavoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33:2-16.
- Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Hirose, Y., Wang, A., Mori, H., et al. (1994). Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: Comparison with the protective effect of β -carotene. *Cancer Res*. 54:4653-9.
- Villar, M., Villavicencio, O. (2001). Manual de fitoterapia. EsSalud. OPS. Lima. p.153-156.
- Vinegar, H. (1969). Biphasic development of carrageen in edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 166(1):99-103.
- Winter, C.A., E.A. Risley & C.W. Nuss. (1962). Carrageenan-induced oedema in hind paw of rats-an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of Society Experimental Biology Medicine*. 111: 544 - 547.