



Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” *in vivo* en ratones con lesión hepática

Farah Mendoza-Romero¹; Jorge Arroyo-Acevedo^{2,3}

Información del artículo

Hist

Recibido: 16/11/18
Aprobado: 01/12/18

Autor correspondal

Farah Mendoza-Romero
farita14@hotmail.com

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener
conflictos de interés.

Citar como

Mendoza-Romero F; Arroyo-Acevedo J. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” *in vivo* en ratones con lesión hepática. Rev Peru Med Integrativa. 2018;3(3):118-22.

Resumen

Objetivos. Evaluar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” *in vivo* mediante el uso de ratones con lesión hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCL₄). **Materiales y métodos.** Estudio experimental. Se utilizó cuatro grupos de seis ratones albinos *Mus musculus* - cepa Balb/c/CNPB: un grupo blanco, un grupo control que recibió vitamina E (Vitesol® E 400 U.I) y dos grupos a los que se les administró extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” en dosis de 50 y 300 mg/kg. Para la evaluación del efecto antioxidante *in vivo* se sometió a los ratones a un modelo experimental de hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono (CCL₄) antes y durante las intervenciones. Mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico se cuantificó el malondialdehído (MDA) formado y se calculó el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica (POL) con el que se establecieron diferencias por grupos. **Resultados.** El tamizaje fitoquímico mostro la presencia muy abundante de flavonoides. Los porcentajes de inhibición de la POL obtenidos fueron de un 22 y 45%, para las dosis de 50 y 300 mg/kg del extracto hidroalcohólico. Si bien se encontraron diferencias significativas en la comparación entre grupos ($p>0,05$), las intervenciones experimentales no superaron los resultados del grupo control con vitamina E (60%). **Conclusiones.** En las condiciones experimentales, el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” a dosis de 50 y 300 mg/kg presenta actividad antioxidante, siendo esta aun menor a la mostrada por el estándar (vitamina E).

Palabras clave: Plantas medicinales; Antioxidantes; *Calceolariaceae*; Malondialdehído; flavonoides (Fuente: DeCS).

In vivo antioxidant effect of *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” hydro-alcoholic extract in mice with hepatic injury

Abstract

Objective. To evaluate the *in vivo* antioxidant effect of *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” hydro-alcoholic extract through the use of mice with hepatic injury induced by carbon tetrachloride (CCL₄). **Materials and methods.** An experimental study. Four groups of 6 albino *Mus musculus* - strain Balb/c/CNPB mice were used: a no-intervention group; a control group, which received Vitamin E (VITESOL® E 400 U.I); which *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” hydro-alcoholic extract in doses of 50 mg/kg and 300 mg/kg of the extract. To evaluate *in vivo* antioxidant effect, mice were subjected to an experimental model of hepatotoxicity by carbon tetrachloride (CCL₄) before and during experimental interventions. Through the thiobarbituric acid reaction, the malondialdehyde (MDA) formed was quantified and the percentage inhibition of lipid peroxidation (POL) was calculated. With this data, statistical differences were established by groups. **Results.** Phytochemical screening showed “very abundant” presence of flavonoids. The percentages of POL inhibition obtained were 22% and 45%, for the doses of 50 mg/kg and 300 mg/kg of hydro-alcoholic extract. Although significant differences were found in the comparison between groups ($p> 0.05$), the experimental interventions did not surpass the results of control group intervened with Vitamin E (60%). **Conclusions.** Under the experimental conditions, the *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” hydro-alcoholic extract (at doses of 50 mg/kg and 300 mg/kg) has antioxidant activity, but the effect found were lower than the standard (Vitamin E).

Keywords: Medicinal plants; Antioxidants; *Calceolariaceae*; Malondialdehyde, flavonoids (Source: MeSH).

¹ Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

² Laboratorio de Farmacología Experimental, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

³ Instituto de Investigaciones Clínicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Introducción

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y las defensas antioxidantes; producto de este desequilibrio se forman radicales libres, moléculas inestables con electrones no apareados que son extremadamente reactivos ⁽¹⁾.

Cuando estos radicales libres interactúan con otras moléculas biológicas pueden dar inicio a una cascada de reacciones como lipoperoxidación o peroxidación lipídica, daño proteico y los daños oxidativos en ácidos nucleicos. La producción sostenida y crónica de estas reacciones es tóxica en tejidos u órganos produciendo lesión celular, necrosis y apoptosis. Por ello, su estudio por biomarcadores como subproductos de oxidación proteica (proteínas carboniladas, S-glutathionilación y nitrotirosina); oxidación del ADN (ej. 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina o 8-OH-dG, fosforilación de los residuos de histona y el aumento de la migración de ADN) o la peroxidación lipídica (malonaldehído o MDA y 4-hidroxinonenal o 4-HNE, entre otros) tienen importancia en el descubrimiento de moléculas que puedan tener una acción antioxidante y, por ende, sean de utilidad para el manejo de enfermedades cuya fisiopatología esté relacionada con los efectos del estrés oxidativo ^(2,3).

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas, mediante la interacción con compuestos intermedios en la producción de ROS o inhibiendo otras reacciones de oxidación mediante la autooxidación, protegiendo a las células contra el daño causado por moléculas inestables como los radicales libres ⁽²⁾. Numerosos agentes han sido descubiertos o sintetizados por el hombre; la gran mayoría de ellos son plantas medicinales ancestralmente utilizadas, o sus derivados ^(4,5).

Dentro de los metabolitos secundarios de plantas más relacionados con la aparición de efectos antioxidantes se encuentran a los flavonoides (del latín *flavus*, «amarillo»), que son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como vía biosintética de los flavonoides. Si bien se han identificado y aislado alrededor de 9000 flavonoides, todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua ^(6,7).

Calceolaria engleriana Kraenzl "wawillay", es una especie perteneciente a la familia Calceolariaceae, ampliamente distribuida en el Perú en los departamentos de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, y Puno entre los 2000-4500 m de altitud, y en Junín entre los 3300-3400 m de altitud ⁽⁸⁾. Esta especie presenta diversos usos tradicionales como analgésico en casos de fracturas o torceduras;

antipirético, antiinflamatorio, antitúxico, digestivo, entre otros ^(9,10).

Estudios preliminares han encontrado resultados prometedores en la cuantificación de flavonoides y fenoles, lo que incrementa la posibilidad de encontrar efectos biológicos en los extractos derivados de esta especie. Por ello, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" *in vivo* mediante el uso de ratones con lesión hepática inducida por tetracloruro de carbono (CCL₄).

Materiales y métodos

Muestra vegetal

Se procedió a recolectar la muestra vegetal *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay" en el distrito de Quinua, provincia de Huamanga, región Ayacucho, en horas de la tarde, durante el mes de marzo de 2017. Esta especie fue identificada en el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Preparación del extracto hidroalcohólico

En primer lugar, se procedió a seleccionar las plantas (tallos tiernos, hojas y flores) que no estén dañadas ni maltratadas, para ser secadas en sombra. Posteriormente, la muestra vegetal seca se molió y maceró en alcohol 70°, colocado en frasco ámbar durante una semana, con agitación constante, luego se filtró y evaporó el solvente en estufa Precisión Scientific CO. Thelco, Model 28 (SER. N.º 17-W-10), a 37 °C.

Este proceso se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Farmacología Experimental, Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Animales de experimentación

Se utilizaron 24 ratones albinos machos de la especie *Mus musculus*, de la cepa Balb/c/CNPB; de un peso aproximado de 30 - 35 g, de 25 a 32 días de edad, los cuales fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud (INS, Lima-Perú) e instalados, para su climatización durante 48 h, en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y temperatura de 22 a 26 °C. Se realizaron todas las actividades necesarias para evitar malestar innecesario a los animales experimentales, los cuales fueron manipulados por un investigador con

conocimientos de técnicas adecuadas de experimentación, de acuerdo con las directrices de la Asociación Médica Mundial ⁽¹¹⁾.

Tamizaje fitoquímico ⁽¹²⁾

Se realizaron reacciones de coloración y precipitación para identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Se utilizaron las reacciones de Dragendorff y Mayer, para alcaloides; Baljet, para lactonas y cumarinas; Borntrager, para quinonas; Benedict, para azúcares reductores; catequinas espuma, para saponinas; cloruro férrico, para compuestos fenólicos; ninhidrina, para aminoácidos y, finalmente, Shinoda y Kedde, para flavonoides. La presencia de estos compuestos se midió en forma ordinal, siendo (+): poco, (++) bastante, (+++): abundante y (++++) muy abundante.

Inducción de hepatotoxicidad con tetracloruro de carbono (CCL₄)

Para la evaluación del efecto antioxidante *in vivo* del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", se seleccionó un modelo experimental de hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono (CCL₄) descrito por Recknagel en 1967, que tiene como principio la producción de peroxidación lipídica inducida por el radical tricloruro (CCL₃), lo que a la larga conduce a la destrucción de los hepatocitos y la consiguiente pérdida de función ⁽¹³⁾. En el presente estudio, la intoxicación con CCL₄ se realizó con una solución a partes iguales de CCL₄ y goma tragacanto 1%, por vía oral (sonda orogástrica) durante 4 días.

Medición de la actividad antioxidante *in vivo*

Se ensayaron cuatro grupos experimentales de seis ratones cada uno: Grupo 1: Blanco (goma tragacanto 1%); Grupo 2: Control (vitamina E [Vitesol® E] 400 U.I); Grupo 3: extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* 50 mg/kg; Grupo 4: extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* 300 mg/kg.

Se siguió en cada grupo un tratamiento de cuatro días antes y cuatro días durante la intoxicación con CCL₄, cada 12 h, por vía oral en un volumen de 0,5 mL a través de sonda orogástrica de acuerdo con las diferentes dosis. Posteriormente, los ratones fueron sacrificados por inyección de pentobarbital sódico 100 mg/kg y se extrajeron los hígados. Se utilizó 1 g de tejido hepático para su homogenización y posterior cuantificación de malonaldehído (MDA). La peroxidación lipídica fue determinada por la medida espectrofotométrica de la sustancia coloreada que se forma cuando reacciona el MDA con el ácido tiobarbitúrico, siguiendo el procedimiento descrito a continuación ⁽¹⁴⁾:

- Se extrajo 200 µL de cada homogenato y se les añadió 0,8 mL de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0,3 g de TBA, 15 mL de ácido tricloroacético (TCA), 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y agua hasta completar 100 mL).
- Se agitan los tubos e incuban en baño María a 100 EC, durante 15 min. Se centrifugaron todos los tubos a 1000 G durante 5 min y se leyó el sobrenadante en un espectrofotómetro a 535 nm.
- El efecto antioxidante de cada compuesto de estudio se expresó como porcentaje de inhibición y se calculó según la fórmula:

$$DO_{t20} - DO_{t0} = DO_d$$

$$DO_m - DO_{t0} = DO_c$$

$$\% \text{ de reacción} = \frac{(DO_c \times 100)}{DO_d}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de reacción}$$

Donde:

DO_{t20} = densidad óptica en tiempo 20 min (blanco máximo reacción).

DO_{t0} = densidad óptica en tiempo 0 min (blanco reactivo).

DO_m = densidad óptica de la muestra.

Análisis estadístico

Se evaluaron diferencias entre los porcentajes de inhibición por medio del análisis de varianzas (ANOVA) de una vía, con prueba *post hoc* de Tukey. Se consideró que existen diferencias significativas cuando se obtuvo un valor de $p < 0,05$. Los resultados de los experimentos son presentados como valores de media $\pm$ el error estándar.

Resultados

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl mostró la presencia, en forma muy abundante, de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas. Adicionalmente, cabe destacar que se encontraron alcaloides, en poca proporción (Tabla 1).

Al evaluar los índices de peroxidación lipídica, se encontró que el grupo blanco mostró los mayores porcentajes de reacción (99,2%), seguido de los grupos de estudio a los que se les administró extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* en las dosis de 50 y 300 mg/kg (78 y 55%, respectivamente). Por otro lado, el grupo al que se le administró vitamina E (80 UI/mL) fue el que menor porcentaje de reacción mostró (40%).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos tratados, tanto al aplicar el ANOVA como en las

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay”

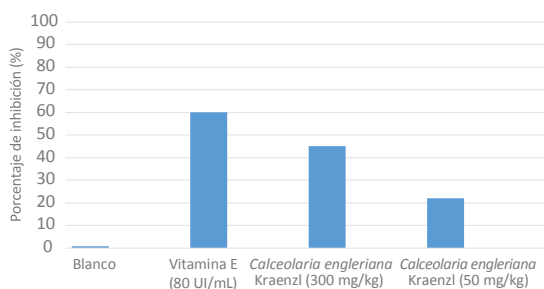
Reacción	Compuestos	Presencia (*)
Dragendorff	Alcaloides	(+)
Mayer	Alcaloides	(+)
Baljet	Lactonas y cumarinas	(+++)
Borntrager	Quinonas	(+++)
Catequinas	Catequinas	(+++)
Benedict	Azúcares reductores	(+++)
Espuma	Saponinas	(++++)
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	(++++)
Ninhidrina	Aminoácidos	(++++)
Shinoda	Flavonoides	(++++)
Kedde	Flavonoides	(+++)

(*)= (+): poco, (++) bastante, (+++) abundante y (++++): muy abundante.

pruebas *post hoc*, en todas las combinaciones. Se encontró porcentajes de inhibición de peroxidación lipídica, en el grupo control de 0,8%, mientras que en el grupo con vitamina E, este alcanza su mayor valor (60%). En el caso de los grupos experimentales, acorde a lo previamente mencionado en los porcentajes de reacción, los sujetos que recibieron 50 y 300 mg/kg del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana*, mostraron 22 y 45% respectivamente (Gráfico 1).

Discusión

El potencial terapéutico de las plantas o productos relacionados se asocia con efectos biológicos diferentes, provocados por la combinación sinérgica de varios grupos de compuestos químicos en lugar de mezclas individuales aisladas. Los compuestos polifenólicos son un grupo

**Gráfico 1.** Porcentaje de inhibición encontrado por grupo de estudio.

esencial de metabolitos vegetales esenciales para la dieta humana y la salud en general ⁽¹⁵⁾.

En el caso del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana*, el tamizaje fitoquímico mostró la abundante presencia de flavonoides. Asimismo, se observó la presencia de otros metabolitos secundarios como catequinas o compuestos fenólicos. Estos resultados difieren de lo encontrado por Almeyda Rodas, quien evidenció presencia no abundante de flavonoides en el extracto atomizado de las hojas de esta especie vegetal ⁽¹⁰⁾. En forma similar, Coronado Bendejú tamizó la droga cruda de *Calceolaria engleriana*; en la cual encontró menor proporción de flavonoides, en comparación a otros componentes como las saponinas o los fenoles, los cuales, al igual que en este estudio, se encontraron en forma abundante ⁽¹⁶⁾. Futuros estudios deberán evaluar si la forma de extracción o la parte de la planta utilizada influyen en la cantidad de flavonoides encontrados.

Si bien los flavonoides han demostrado sus efectos como antioxidante, modulando la actividad enzimática, induciendo la apoptosis, promoviendo la diferenciación celular, regulando la respuesta inmune e inhibiendo la proliferación celular y la angiogénesis ⁽¹⁷⁾; el presente estudio tiene la limitante de no realizar una cuantificación exacta o un aislamiento de este componente, por ende, evalúa el efecto antioxidante no solo de la presencia de flavonoides, sino de la interacción de estos con otros componentes.

El malondialdehído (MDA) es una molécula tóxica considerada como un biomarcador del estrés oxidativo, es uno de los ejemplos de los productos finales de las reacciones de la peroxidación lipídica ⁽¹⁸⁾. En esta investigación se encontró que los grupos experimentales a los que se les administró extracto hidroalcohólico de *C. engleriana*, a dosis de 50 y 300 mg/kg, tuvieron porcentajes de inhibición de 22 y 45%, respectivamente. Estos resultados fueron inferiores a los encontrados en el grupo control (60%), pero fueron estadísticamente significativos en comparación al blanco (0,8%), lo que permitiría decir que sí se encontró cierta actividad antioxidante, sugiriendo que esta se incrementa en forma directamente proporcional a la dosis. Asimismo, estos resultados son consistentes con lo encontrado por Almeyda Rodas, quien evidenció actividad antioxidante del extracto atomizado de *C. engleriana*, mediante el método de DPPH, a dosis de 25, 50, 100, 150, 200, y 250 µg/mL; las que fueron equivalentes al estándar utilizado (ácido gálico) ⁽¹⁰⁾.

Por otro lado, Condorhuamán Figueroa evaluó la actividad antioxidante del extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, mediante el mismo método que el utilizado en este estudio, por medio del que encontró disminución de

niveles de MDA en las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg, no evidenciándose una relación dosis-respuesta⁽¹⁹⁾.

Esta investigación presenta la limitación de no realizar un tamizaje fitoquímico más específico, por lo que no se conocen que tipo de flavonoides u otros componentes de importancia biológica presenta este extracto hidroalcohólico. Adicionalmente, el diseño solo consideró la aplicación de dos dosis experimentales, por lo que no se pueden observar relaciones dosis-respuesta, que podrían ayudar a caracterizar

mejor el efecto encontrado. Se sugiere ahondar más en la caracterización de esta especie, orientándose a su potencial uso terapéutico, evaluando en modelos experimentales sus efectos biológicos y su perfil de toxicidad.

Se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenz "wawillay" a dosis de 50 y 300 mg/kg presenta actividad antioxidante, siendo esta aun menor a la mostrada por el estándar (vitamina E).

Referencias bibliográficas

1. Coronado H M, Vega y León S, Gutiérrez T R, Vázquez F M, Radilla V C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición* 2015;42(2):206–12.
2. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018;13:757–72.
3. Corrales LC, Muñoz Ariza MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova* 2012;10(18):213–25.
4. Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences* 2015;11(8):982–91.
5. Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016;2016(9130976):36.
6. D'Amelia V, Aversano R, Chiaiese P, Carputo D. The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochem Rev* 2018;17(3):611–25.
7. Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci* 2012;196:67–76.
8. Puppo P. Nuevas distribuciones para 24 especies de *Calceolaria* (Calceolariaceae) en el Perú y primer registro de *Calceolaria perfoliata*. *Revista Peruana de Biología* 2010;17(2):155–62.
9. Thomas E, Vandebroek I, Sanca S, Van Damme P. Cultural significance of medicinal plant families and species among Quechua farmers in Apillapampa, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;122(1):60–7.
10. Almeyda Rodas WA. Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay", Ayacucho 2017. [Internet]. 2017 [citado 2019 mar 6]; Available from: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2333>
11. The World Medical Association. Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica [Internet]. 2016 [citado 2017 mar 2]; Available from: <https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-la-amm-sobre-el-uso-de-animales-en-la-investigacion-biomedica/>
12. Miranda M. Farmacognosia y Productos naturales. 1ª ed. Cuba: Ed. Félix Varela; 2001.
13. Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 1967;19(2):145–208.
14. Perez J, Sánchez N, Bu M. Actividad antioxidante *in vivo* e *in vitro* de un extracto natural de origen vegetal. *Rev Cubana Plant Med* 1998;3(3):19–22.
15. Amri FSA, Hossain MA. Comparison of total phenols, flavonoids and antioxidant potential of local and imported ripe bananas. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences* 2018;5(4):245–51.
16. Coronado Bendejú RN. Validación del método analítico por espectrofotometría UV para la cuantificación de flavonoides totales en *Calceolaria engleriana* Kraenzl "wawillay". Ayacucho - 2016 [Internet]. 2016 [citado 2019 mar 6]; Available from: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2550>
17. García-Tirado J, Rieger-Reyes C, Saz-Peiró P. Efecto de los flavonoides en la prevención del cáncer de pulmón: revisión sistemática. *Med Clin (Barc)* 2012;139(8):358–63.
18. Sarangarajan R, Meera S, Rukkumani R, Sankar P, Anuradha G. Antioxidants: Friend or foe? *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2017;10(12):1111–6.
19. Condorhuamán Figueroa MY. Efecto hipotensor del extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* kraenz en ratas hipertensas inducidas por L-NAME [Internet]. 2009 [citado 2019 mar 6]; Available from: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/238>