



## Efecto Antiinflamatorio Preclínico del Polvo Seco de *Caléndula officinalis*

Yanier NÚÑEZ FIGUEREDO <sup>1\*</sup>, Claudia MONTERO ALARCÓN <sup>1</sup>,  
Sara AGÜERO FERNÁNDEZ <sup>1</sup> & Adriana MUÑOZ CERNUDA <sup>2</sup>

<sup>1</sup> UCTB Control Biológico. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.  
Calle 17 N° 6208 e/ 62 y 64. Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

<sup>2</sup> UCTB Tecnologías Básicas. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos.  
Ave. 26 N° 1650 e/ Puentes Grandes y Boyeros. Plaza de La Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba

**RESUMEN.** Para demostrar la actividad antiinflamatoria del polvo seco *Caléndula officinalis* secado por atomización se emplearon dosis de 50, 150 y 450 mg/Kg y se evaluó el efecto sobre la inflamación aguda provocada por carragenina, dextrán, histamina y serotonina y granuloma inducido por discos de algodón en ratas y edema auricular inducido por aceite de croton en ratones. El polvo seco mostró efecto inhibitorio sobre los diferentes modelos empleados sin afectar el peso del timo y las glándulas suprarrenales. Estos resultados muestran que el método de secado por atomización permite la obtención de una materia prima de *Caléndula officinalis* activa frente a procesos inflamatorios de naturaleza diversa.

**SUMMARY.** "Preclinical Anti-Inflammatory Effects of Dry Powder of *Caléndula officinalis*". With the objective to demonstrate the anti-inflammatory effect of *Caléndula officinalis* dry powder, doses of 50, 150 and 450 were used on inflammation induced by carragenin, dextran, histamine and serotonin, the granulome induced by cotton pellets in rats and ear inflammation induced by croton oil in mice. The spray dried powder of *Caléndula officinalis* inhibited the inflammatory process in all animal model employed without affecting tymus's and adrenal's weight. These results show that the powder of *Caléndula officinalis* obtained by spray drying is active in inflammatory processes of diverse nature.

### INTRODUCCIÓN

*Caléndula officinalis* L. (Compuestas) es una planta anual que se cultiva en todo el mundo y sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como para la preparación de productos terminados en las industrias farmacéutica y cosmética. En Cuba *C. officinalis* crece adecuadamente en condiciones de cultivo y sus flores cumplen con los requisitos establecidos por las farmacopeas internacionales para su uso como planta medicinal. Se trata de una hierba anual más o menos pilosa, de 30 a 60 cm de altura, de hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; las cabezuelas florales aparecen solitarias en pedúnculos robustos, vistosos, de 3,75 a 5 cm de diámetro; los radios son planos, extendidos, de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche; a veces la planta porta varias cabezuelas pedunculadas en un círculo <sup>1</sup>.

Las decocciones de las flores de *C. officinalis* tienen un amplio espectro en cuanto al tratamiento de diversas afecciones, entre las que podemos citar su uso para la curación de las heridas, como colutorio en las estomatitis y en la piorrea, en el tratamiento de la gastritis, de las úlceras, hepatitis y otras enfermedades gastrointestinales, de la hipertensión, taquicardia y arritmia, de diversas afecciones del sistema urinario, así como en enfermedades del Sistema Nervioso Central y Periférico. Todos estos usos infieren que los extractos acuosos de las flores de *C. officinalis* podrían presentar las siguientes propiedades farmacológicas: cicatrizante, antiinflamatorio, antibacteriano y tranquilizante, lo cual hace de ésta una materia prima natural de interés para la industria farmacéutica <sup>1</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el extracto acuoso secado por atomización en diferentes modelos experimentales de inflamación con el objetivo de demostrar las propie-

**PALABRAS CLAVE:** Actividad antiinflamatoria, *Caléndula officinalis*, Modelos experimentales.

**KEY WORDS:** Anti-inflammatory activity, Animal model, *Caléndula officinalis*.

\* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: tomasroberto@infomed.sld.cu; yaniernf1975@yahoo.es

dades antiinflamatorias de esta materia prima para su posterior utilización en la elaboración de medicamentos.

## **MATERIALES Y METODO**

### **Material**

La sustancia de prueba fue obtenida a partir de un extracto acuoso seco de *C. officinalis* secado por atomización (Lote: L 04005). Procedencia: UCTB Tecnología Básica

### **Animales**

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se emplearon Ratas Wistar hembras de 150 a 200g de masa corporal, todas procedentes de la colonia de la UCTB Control Biológico del CIDEM. Los animales fueron alojados en una sala con condiciones de temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, cama con viruta con cambio cada 48 h y un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h. El pienso peletizado CMO 1000, dieta proveniente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), y el agua fueron administrados a libre demanda. Todos los procedimientos fueron ejecutados de acuerdo a las normas éticas dictadas por la Unión Europea para la experimentación animal.

### **Reactivos**

Fosfato ácido de histamina, pentobarbital sódico, sulfato de serotonina (BDH), dextrán 40, carragenina, aceite de croton (Sigma), penicilina procaínica (Shenzhen Runch Industrial Corp. China). En todos los ensayos, las dosis empleadas del extracto acuoso seco de *C. officinalis* fueron de 50, 150 y 450 mg/Kg disueltas en agua destilada administradas por vía oral; también se formó un grupo control administrado con agua destilada. Los ensayos agudos recibieron una dosis única de los diferentes tratamientos y los animales pertenecientes al modelo de granuloma inducido por pellets de algodón recibieron los diferentes tratamientos durante 7 días consecutivos

### **Inflamación aguda inducida por diferentes agentes flogísticos**

Los animales recibieron los diferentes tratamientos dependiendo del grupo al que pertenecían. El edema fue inducido en la pata derecha trasera por inyección de un volumen de 0,1 mL de soluciones de los diferentes agentes flogísticos: carragenina 1%, dextrán 1%, histamina 1% y serotonina 0,01% en solución salina <sup>2,3</sup>. La pata

contralateral recibió igual volumen de solución salina. Los volúmenes de ambas patas fueron medidos con ayuda de un pletismómetro (UGO Basile) 4 h después de inducido el edema por carragenina y a la hora en el resto de los edemas. El volumen del edema se determinó a partir de la diferencia entre los volúmenes de la pata derecha e izquierda. La actividad antiinflamatoria se expresó a través del porcentaje de inhibición del edema con respecto al grupo control.

### **Edema auricular inducido por aceite de croton**

Una hora después de la administración de los diferentes tratamientos se provocó el edema auricular administrando 50 µL de aceite de croton 5% en etanol 95% en la oreja derecha y 50 µL de etanol 95% en la oreja izquierda de los animales. Transcurridas 3 h de la inducción de la inflamación, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro de cada oreja. Los mismos fueron pesados en una balanza analítica para posteriormente calcular la diferencia entre el peso de la oreja tratada y el de la oreja control. La actividad antiinflamatoria se expresó a través del porcentaje de inhibición del edema con respecto al grupo control <sup>4,5</sup>.

### **Granuloma inducido por pellets de algodón**

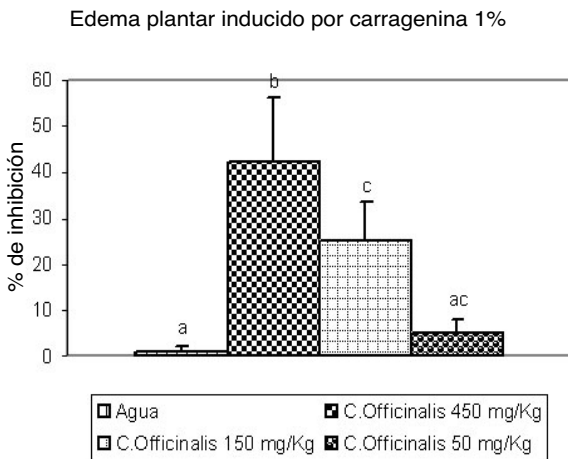
Cuatro discos de algodón de 50 mg de peso fueron implantados bajo la región escapular de cada animal. Veinticuatro horas después de la última administración se sacrificaron todas las ratas y se extrajeron los granulomas, el timo y las glándulas suprarrenales (GS) de cada animal para la determinación de sus pesos <sup>6</sup>.

Procesamiento estadístico: Se calculó la media  $\pm$  desviación estándar de los parámetros analizados en cada ensayo para cada grupo. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó un test de Duncan considerándose diferencias significativas de al menos  $p < 0.05$  <sup>7</sup>.

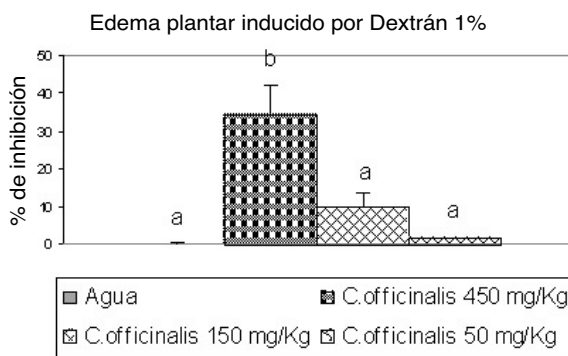
## **RESULTADOS**

### **Inflamación aguda inducida por carragenina**

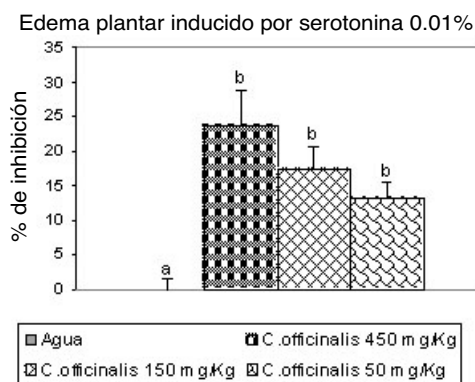
El edema inducido por inyección subplantar de 0,1 mL de carragenina al 1% mostró una disminución dosis-dependiente por el tratamiento con las diferentes dosis del *C. officinalis* (Fig. 1). A la dosis de 150 mg/kg ya se observaba una disminución del  $25,24 \pm 8,29$  % de la inflamación y a la dosis de 450 mg/kg el edema dis-



**Figura 1.** Efecto de diferentes dosis de *C. officinalis* sobre el edema subplantar inducido por carragenina al 1%. Las barras representan la media (desviación estándar (n=10)). Letras diferentes, las medias difieren con respecto al grupo control para  $p < 0,05$ .



**Figura 2.** Efecto de diferentes dosis de *C. officinalis* sobre el edema subplantar inducido por dextrán 1%. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=10). Letras diferentes, las medias difieren con respecto al grupo control para  $p < 0,05$ .



**Figura 3.** Efecto de diferentes dosis de *C. officinalis* sobre el edema subplantar inducido por serotonina 0.01%. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n = 10). Letras diferentes, las medias difieren con respecto al grupo control para  $p < 0,05$ .

minuyó en un  $42,23 \pm 14,27$  %. La dosis menor disminuyó el edema en un  $5,23 \pm 2,8$  %, presentándose diferencias significativas para  $p < 0,01$  entre los grupos tratados con las dosis de 150 y 450 mg/Kg de *C. officinalis* y el grupo control.

#### **Inflamación aguda inducida por dextrán**

*C. officinalis* provocó una disminución significativa (para  $p < 0,05$ ) del edema inducido por dextrán al 1 % en la pata de la rata (Fig. 2) solamente cuando fue administrado a la dosis de 450 mg/Kg.

#### **Inflamación aguda inducida por serotonina**

Los porcentajes de inhibición del edema inducido por la inyección subplantar de 0.1 mL de serotonina al 0,01 % en los animales tratados con las diferentes dosis del *C. officinalis* presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control para  $p < 0,05$ , obteniéndose valores de por ciento de inhibición del edema de  $13,27 \pm 2,29$ ,  $17,50 \pm 3,16$  y  $23,72 \pm 5,10$  % para las dosis de 50, 150 y 450 mg/kg, respectivamente (Fig. 3).

#### **Inflamación aguda inducida por histamina**

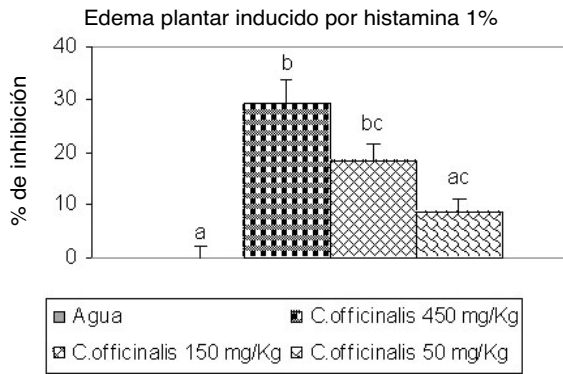
El edema inducido por histamina al 1% mostró una disminución dosis-dependiente por el tratamiento con las diferentes dosis del *C. officinalis* (Fig. 4). Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron  $8,49 \pm 2,69$ ,  $18,44 \pm 3,20$  y  $29,26 \pm 4,56$  % para las dosis de 50, 150 y 450 mg/kg respectivamente.

#### **Edema auricular inducido por aceite de croton**

En el edema auricular inducido por aceite de croton se encontró una disminución significativa del mismo (para  $p < 0,05$ ) en los animales tratados con las diferentes dosis de *C. officinalis* con respecto al grupo control (Fig. 5). Los porcentajes de inhibición fueron de  $15,82 \pm 5,20$ ;  $39,92 \pm 8,23$  y  $49,50 \pm 12,35$  para las dosis de 50, 150 y 450 mg/Kg respectivamente.

#### **Granuloma inducido por pellets de algodón**

La administración diaria de *C. officinalis* a las dosis de 150 y 450 mg/kg inhibió significativamente la formación de tejido granulomatoso con respecto al grupo control negativo; por otra parte fue capaz de inhibir la formación de tejido granulomatoso sin afectar el peso del timo (Tabla 1). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al peso de las glándulas suprarrenales en ninguno de los tratamientos empleados.

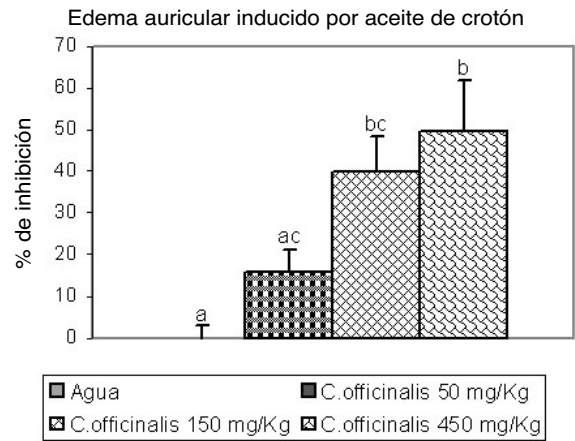


**Figura 4.** Efecto de diferentes dosis de *C. officinalis* sobre el edema subplantar inducido por histamina 1%. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=10). Letras diferentes, las medias difieren con respecto al grupo control para  $p < 0.05$ .

**DISCUSIÓN**

En el presente trabajo se emplearon modelos agudos de inflamación condicionados por diferentes mediadores proinflamatorios. La inducción de diferentes edemas plantares ha sido ampliamente reconocido como modelos de inflamación aguda <sup>6,8</sup>. En el caso del edema inducido por dextrán la reacción inflamatoria está condicionada por liberación de histamina y serotonina <sup>6,9</sup>, por degranulación de los mastocitos, en tanto que en el edema por carragenina se encuentran involucrados estos autacoides en la fase inicial, pero alrededor de las 4-5 h, la inflamación está condicionada principalmente por la presencia de prostaglandinas E<sub>2</sub> y leucotrienos B<sub>4</sub> <sup>8,10</sup>; de ahí que los compuestos inhibidores de la síntesis de dichos mediadores o antagonistas de sus receptores resultan eficaces en la inhibición de edema inducido <sup>6</sup>.

A partir de los porcentajes de inhibición del edema obtenido con la carragenina se puede sugerir que la *C. officinalis* inhibe la liberación o acción de las prostaglandinas parte la inhibición de los edemas inducidos por serotonina e



**Figura 5.** Efecto de diferentes dosis de *C. officinalis* sobre el edema auricular inducido por aceite de croton. Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=10). Letras diferentes difieren con respecto al grupo control para  $p < 0.05$

histamina, pueden explicar la disminución significativa del edema inducido por dextrán, probablemente por un bloqueo directo de los receptores de estos autacoides.

La inducción de edema auricular por aceite de croton es otro modelo de inflamación aguda ampliamente empleado, en el cual se liberan mediadores de tipo eicosanoides y se induce la degranulación de mastocitos, es por ello que los compuestos inhibidores de la biosíntesis y/o liberación de prostaglandinas y leucotrienos o los fármacos antagonistas de sus respectivos receptores, pueden atenuar el proceso inflamatorio inducido <sup>4,5,12</sup>, los resultados inhibitorios del edema auricular provocado, pudiesen estar relacionados con los resultados obtenidos en el edema plantar inducido por carragenina y dextrán al 1 %. En este sentido ha sido demostrado por otros autores que los alcoholes triterpénicos presentes en la planta inhiben la inflamación tópica inducida por aceite de croton <sup>12,13</sup>.

Por otra parte la implantación subcutánea de

	Agua	<i>C. officinalis</i> 50 mg/Kg	<i>C. officinalis</i> 150 mg/Kg	<i>C. officinalis</i> 450 mg/Kg
Peso fresco (PF)	1,42 $\pm$ 0,355	1,074 $\pm$ 0,325	0,898 $\pm$ 0,196*	0,823 $\pm$ 0,102*
Peso seco (PS)	0,386 $\pm$ 0,110	0,283 $\pm$ 0,52	0,230 $\pm$ 0,45*	0,187 $\pm$ 0,02*
Timo	0,001106 $\pm$ 0,0002	0,001106 $\pm$ 0,0002	0,001101 $\pm$ 0,00015	0,001108 $\pm$ 0,0002
GSD	0,000093 $\pm$ 0,000017	0,000092 $\pm$ 0,00002	0,000093 $\pm$ 0,000016	0,000087 $\pm$ 0,000018
GSI	0,000092 $\pm$ 0,000020	0,000092 $\pm$ 0,000019	0,000095 $\pm$ 0,00002	0,000085 $\pm$ 0,000013
PF-PS	1,03016 $\pm$ 0,232	0,79166 $\pm$ 0,178	0,6677 $\pm$ 0,153*	0,6363 $\pm$ 0,152*

**Tabla 1.** Efecto de diferentes dosis de *C. officinalis* sobre el granuloma inducido por pellets de algodón. Las barras representan la media de cada peso determinado (n = 10).

\*: Difiere con respecto al grupo control para  $p < 0,05$ .

discos de algodón en ratas da lugar a la formación de un granuloma que consiste en una cápsula fibrosa vascularizada que contiene fibroblastos e infiltrado de células mononucleares. En la respuesta inflamatoria subcrónica que se origina en este proceso están involucrados de manera significativa los productos de la lipooxigenasa, aunque también se liberan prostaglandinas en menores cantidades, por lo que los antiinflamatorios esteroidales presentan mayor eficacia para revertir o impedir el daño provocado<sup>6,14</sup>.

Los resultados obtenidos en los ensayos de inflamación plantar inducido por administración de carragenina al 1% y el edema auricular inducido por aceite de croton, indican un posible efecto esteroideal, inhibidor de la ciclooxigenasa y/o lipooxigenasa o antagonismo de los receptores de los metabolitos proinflamatorios liberados. Los resultados observados en el ensayo de inflamación subcrónica por implantación subcutánea de discos de algodón sugieren la presencia de mecanismos antiinflamatorios en los animales tratados con *C. officinalis* relacionados principalmente con la posible inhibición de la lipooxigenasa o con antagonismo de los receptores de los leucotrienos, aún cuando también podría tratarse de un mecanismo antiinflamatorio tipo esteroideal, aunque en este caso no se observó disminución del peso relativo del timo ni de las glándulas suprarrenales.

Basados en los resultados obtenidos podemos concluir que el extracto acuoso seco de *C. officinalis* posee actividad anti-inflamatoria frente a procesos inflamatorios de naturaleza diversa, pudiendo sus metabolitos activos estar actuando en diferentes pasos de la cascada inflamatoria relacionados con la biosíntesis, liberación y/o antagonismo de los mediadores proinflamatorios que se generan, producto del metabolismo del ácido araquidónico.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roig, J.T. (1974). "Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba", Ed. Ciencia y Técnica, La Habana, pág. 48
2. Winter, C.A., E.A. Risley & G.W. Nuss (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**: 544-7.
3. Ferreira, S.H. (1979) *J. Pharm. Pharmacol.* **31**: 648
4. Cho, J.Y., K.H. Nam, A.R. Kim, J. Park, E.S. Yoo, K.U. Baik, Y.H. Yu & M.H. Park (2001) *J. Pharm. Pharmacol.* **53**:1287-94.
5. Tubaro, A., P. Dri, G. Delbello, C. Zilli & L.R. Della (1985) *Agents Actions* **17**: 347-9.
6. Barzaga, F.P., F.Y. Nuñez, D.C. Carrillo, H.I. Chávez, S.M. González, R. González & M. Echevarría (2004) *Acta Farm. Bonaerense* **23**: 492-7.
7. Sigarroa, A. (1985) "Biometría y Diseño Experimental", Ed. Pueblo y Educación, Ciudad Habana, pág. 430.
8. Turner, R.A. (1965) "Screening methods in pharmacology", Ed. Academic Press. New York and London.
9. Di Rosa, M & D.A. Willoughby (1971) *J. Pharm. Pharmacol.* **23**: 297-8.
10. Di Rosa, M. (1972) *J. Pharm. Pharmacol.* **24**: 89-102.
11. Romay, C., N. Ledon & R. Gonzalez (1998) *Inflamm. Res.* **47**: 334-8.
12. Akihisa, T., K. Yasukawa, H., Oinuma, Y. Kasahara, S. Yamanouchi, M. Takido, K. Kumaki & T. Tamura (1996) *Phytochemistry* **43**: 1255-60.
13. Zitterl, E.K., S. Sosa, J. Jurenitsch, Z.M. Schubert, L.R. Della, A. Tubaro, M. Bertoldi & C. Franz (1997) *J. Ethnopharmacol.* **57**: 139-44.
14. Kunkel, S.L., N.W. Lukacs, R.M. Strieter & S.W. Chensue (1998) *Semin. Respir. Infect.* **13**: 221-8.