

Análisis fitoquímico y de seguridad de los extractos de *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel

Phytochemical analysis and safety assessment of the extract of *Chuquiraga jussieui* J. F. Gmel

Alex Alberto Dueñas Rivadeneira¹, Ulbio Alcivar Cedeño¹, Ervelio Olazábal Manso², Remigio Cortés Rodríguez², Osmani Marrero Chang², Antonio Pérez Donato², Héctor Serrano Pérez², Tania Betancourt Puron², Mirtha Navarro Legarreta²

¹ Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador. Ave. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador

² Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuani km 5 ½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP: 54830

E-mail: alduri81@hotmail.com

RESUMEN. Las especies vegetales que habitan en la cordillera de los Andes, debido a las condiciones agrestes que soportan en cuanto a la temperatura y la altura; han desarrollado características únicas que solo se hallan en estos ecosistemas del continente americano. Dentro de estas especies se encuentra la *Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel, conocida por sus propiedades medicinales. Se realizó la recolección, secado y pulverización de la planta completa, procediéndose posteriormente a obtener un extracto acuoso que fue utilizado para realizar los ensayos de tamizaje fitoquímico en función de determinar la presencia de metabolitos secundarios. También se realizaron ensayos de irritabilidad dérmica y oftálmica; y sensibilización en los modelos biológicos adecuados para tales efectos (conejos y curieles). En el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de tripterpenos y/o esteroides, fenoles y/o taninos, resinas y flavonoides. Los flavonoides fueron identificados por cromatografía de capa delgada. El estudio de irritabilidad en piel permitió categorizar al compuesto como no irritante dérmico; el estudio de irritabilidad oftálmica clasificarlo como irritante ocular moderado, también en conejos albinos; y el estudio de sensibilización en curieles lo clasifica como no sensibilizante. Se concluyó que los principios activos presentes en los extractos presentan una baja toxicidad, lo que permite continuar su desarrollo como biofuncional.

Palabras clave: *Chuquiraga jussieui*, fitoquímica, toxicología.

ABSTRACT. Plant species that inhabit the Andes, have developed unique features, only found in these ecosystems in the Americas, due to the rough conditions of temperature and altitude that they tolerate. Among these species is the *Chuquiraga jussieui* JF Gmel, known for its medicinal properties. The whole plant was harvested, dried and powdered. afterwards an aqueous extract was obtained and a phytochemical screening was performed in order to trace secondary metabolites. Skin and eye irritation tests were also performed on rabbits and guinea pigs. The phytochemical screening revealed the presence of tripterpenos and/or steroids, phenols and/or tannins, resins and flavonoids. Flavonoids were also identified by thin layer chromatography. The study of skin irritability allowed to categorized the compounds as skin non-irritant; the study of ophthalmic irritability classified them as moderate eye irritant, and in albino rabbits, as well; and the sensitization study in guinea pigs classifies them as non-sensitizing. It was concluded that the active ingredients present in the extracts have low toxicity, which allows the development of their biofunctional applications.

Key words: *Chuquiraga jussieui*, phytochemical, toxicology.

INTRODUCCIÓN

La caracterización y los ensayos de seguridad de productos derivados de las plantas son pruebas importantes dentro de la ruta crítica de cualquier compuesto que se pretenda utilizar como biofuncional, fármaco o alimento. En este sentido las evaluaciones de tamizaje fitoquímico, toxicidad oftálmica, dérmica y sensibilización forman parte de

las pruebas preclínicas que exige el registro de estos productos, según las regulaciones establecidas para este tipo de ensayos. (ECETOC, 1990; OECD/OCDE 405, 2012)

El uso de productos de origen natural es una necesidad en países en vías de desarrollo para

complementar, prevenir o tratar las enfermedades con resultados superiores a las terapias tradicionales y a menores costos sin efectos colaterales o indeseables asociados. En tal sentido Ecuador, con una abundante y muy variada flora; refiere el uso tradicional de la especie *Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel. usada desde tiempos ancestrales, por parte de la población nativa en este y otros países de la región, donde tiene como nombre común: flor del caminante, flor de los Andes, chuquiraga y chuquiraguac. Es una especie botánica de la familia Asteraceae, con flores y es la “Flor nacional de Ecuador”. (Villagrán *et al.*, 2003)

Según la tradición popular de la planta se usan las hojas y tallos mantenidos en etanol, para tratar reuma, fiebre e inflamación. La resina como cataplasmas en cardenales, heridas y el alivio de

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de *C. jussieui* fueron colectadas en la Cordillera de los Andes en la Reserva Faunística del volcán Chimborazo, en Ecuador (Lat 1°30'32.66" S Long 78° 51'52.91" W) para lo que fue necesario trasladarse a las áreas endémicas de la planta y realizar posteriormente la caracterización botánica y taxonómica en el Herbario Politécnica Chimborazo. Se depositó la especie en el herbario QCA de la Universidad Católica del Ecuador para ser registrada con la identificación de espécimen correspondiente (Voucher ADD 01). El análisis fitosanitario se realizó en el Laboratorio de la Politécnica Chimborazo, Ecuador.

Las partes aéreas de la planta (follaje y tallos) se lavaron con abundante agua potable y secaron a la sombra (Mora *et al.*, 2013). Para el secado se colocó a la sombra el material en bandejas esmaltadas. Se removió frecuentemente el material en un deshidratador a 40 °C y pesó cada 24 horas hasta que en tres determinaciones se obtuvo un peso constante. (Tanko *et al.*, 2005)

El material seco se pasó por un molino de cuchillas y posteriormente por un tamiz de 0,315 mm, de acero inoxidable, para convertirlo en un sólido pulverulento (SP) de tamaño de partícula uniforme, que fue identificado, almacenado y conservado en una bolsa de plástico sellada herméticamente hasta su utilización.

dolores producidos por luxaciones y fracturas. La infusión o decocción de partes aéreas también se utilizan para el tratamiento de enfermedades de la próstata, del estómago, quemaduras, heridas superficiales, úlceras y como un antipirético (Villagrán *et al.*, 2003). También se le han reportado en estudios experimentales, efectos tales como: antioxidante, antiinflamatorio y antibiótico, entre otros (Alberto *et al.*, 2009; Casado y Landa, 2011; Zampini *et al.*, 2009), lo que sugiere su posible uso para una gran variedad de patologías.

Debido a lo antes expuesto, se trazó como objetivo realizar el tamizaje fitoquímico y el desarrollo de ensayos con los extractos de la planta, así como la evaluación de la seguridad de los mismos para valorar su posible uso como biofuncional.

En la estandarización de la droga cruda fueron determinados los parámetros de calidad que reporta la Norma Ramal de Salud Pública NC:309 (1992): materia orgánica e inorgánica extraña (%); humedad residual (%) por el método azeotrópico; sustancias solubles en agua, etanol al 30, 50 y 80 %; cenizas totales (%), cenizas solubles en agua (%) y cenizas insolubles en ácido clorhídrico al 10 %.

Los ensayos de tamizaje fitoquímico se le realizaron a la droga cruda según los procedimientos descritos para la Investigación Fitoquímica en Plantas Medicinales. (NRSP 309, 1992; NRSP 312, 1992; Mora *et al.* 2013)

Se determinaron los parámetros físico-químicos de control de la calidad que describe la Norma Ramal de Salud Pública 312: características organolépticas olor y color, pH; sólidos totales (%); índice de refracción y densidad relativa. Posteriormente se extrajo con n-butanol, después de reconstituirlo el extracto n-butanólico se concentró en un rotoevaporador hasta evaporar completamente el disolvente; el residuo se disolvió en metanol y precipitó sobre di-isopropiléter, para obtener un crudo de flavonoides.

El extracto se analizó mediante cromatografía en capa delgada, con la utilización de celulosa microgranular CC-41 y como fase móvil n-butanol-ácido acético-agua (BAW) (4:1:5). Para el revelado

de las cromatoplasmas se realizó un análisis a la luz visible y a la luz UV (366 nm) antes y después de exponer el cromatograma a los vapores de NH₃; así como un análisis después de asperjar con solución metanólica al 5 % de AlCl₃, primero al visible y después al de luz UV (366 nm)

Todos los resultados se analizaron estadísticamente según el programa estadístico STATGRAPHICS. Centurion.XV.v15.2.14 para comparar valores medios. También se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación, así como los intervalos de confianza. Se utilizó una probabilidad del 95 %.

Para realizar los ensayos de toxicidad del extracto acuoso se pesaron 20 g del SP y se adicionaron a 1 L de agua destilada a 100 °C en un beaker por un tiempo de 10 min. Este extracto fue utilizado para dosificar los animales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estandarización de la droga cruda (Tabla 1) mostró que ésta tiene un grado de pureza adecuado, pues los valores de materia orgánica e inorgánica extraña, así como los de cenizas, tienen valores muy bajos en relación al resto de los componentes determinados; el contenido de humedad residual se encuentra dentro de los límites establecidos para otras drogas (8-14 %). Al analizar los resultados

Se evaluó la toxicidad por administración dérmica a dosis única del extracto de *C. jussieui*. El estudio se realizó en conejos albinos de cruce Nueva Zelanda x Semi Gigante Blanco. Se aplicó el Método de Irritabilidad/Corrosión Dérmica, propuesto por la OECD 404 (2002). Además, fue evaluada la toxicidad por administración oftálmica a dosis única de un extracto de *C. jussieui*. Se realizaron las aplicaciones, observaciones y evaluaciones de la aparición de eritema, edema y descarga, así como el cálculo del Índice de Irritación Ocular (IIO) y se clasificó el producto. (ECETOC, 1990; OECD/OCDE 405, 2012)

El estudio de sensibilización constó de dos Ensayos en los que se utilizaron curieles de la línea Hartley, se realizó las aplicaciones tópicas dérmicas según lo establecido por OECD 406 (1981).

de sustancias solubles en agua, etanol al 30, 50 y 80 %, se puede señalar que existe igual cantidad de componentes de polaridad intermedia que de alta polaridad. Todos los valores medios de los índices numéricos determinados se compararon con los de drogas oficiales de las cuales sí existen referencias y se observó que los parámetros estaban dentro de los rangos que estas poseen.

Tabla 1. Parámetros de calidad determinados a la droga cruda de *C. jussieui*

Parámetros	Promedios %	DS
Materia orgánica extraña	0,095	0,004
Materia inorgánica extraña	0,118	0,023
Humedad residual	11,667	0,624
Sustancias solubles en agua	5,767c	0,205
Sustancias solubles en etanol y agua al 30 %	7,100a	0,163
Sustancias solubles en etanol y agua al 50 %	9,567b	0,340
Sustancias solubles en etanol y agua al 80 %	9,200b	0,082
Cenizas totales	2,400	0,082

DS = Desviación estándar; a,b,c = Letras diferentes en la misma columna difieren p < 0,05

Al efectuar los ensayos de tamizaje fitoquímico se detectó la presencia de flavonoides, saponinas, mucílagos, triterpenos y/o esteroides, taninos pirocatecólicos y fenoles.

La presencia de flavonoides se hizo evidente en el extracto con una coloración roja. En la prueba de Rosenheim se observó un color violeta que cambia a azul en 20 min. Con el ensayo de Salkowski se

presentó color amarillo ó rojo, sin embargo la muestra presentó coloración verde con el reactivo de Liebermann Burchard lo cual indica la presencia de esteroides que contienen dos enlaces dobles conjugados, y/ó presencia de triterpenos, los que ya han sido identificados en dicha planta con anterioridad (Flagg *et al.*, 1999). El extracto de la muestra presentó hemólisis de los glóbulos rojos. En el ensayo con agua caliente, la muestra presentó

espuma con apariencia de panal estable por 30 min y en agar sangre todas las muestras presentaron hemólisis lo cual permite concluir la presencia de saponinas. El extracto de la muestra presentó coloración más oscura, con el FeCl_3 al 1 %, lo que indica la presencia de taninos condensados. El extracto de la muestra decoloró el reactivo agua a bromo, indicando presencia de fenoles. (Mora et al., 2013)

El extracto de la droga cruda presentó una pigmentación de color pardo oscuro y un olor característico, un pH de $5,30 (\pm 0,014)$; los sólidos totales brindaron un valor de $6,28 \% (\pm 0,011)$; la densidad relativa fue de $0,889 (\pm 0,013)$ y el índice de refracción de $1,256 (\pm 0,012)$

El crudo procedente de las partes aéreas de la planta, entre sus características se destaca que es un sólido de color carmelita oscuro, soluble en agua, polar, estable a temperatura ambiente y muy higroscópico. Luego de aplicar diferentes ensayos se considera la presencia de flavonoides en el crudo, además de constatar la presencia de otros metabolitos. En la evaluación por CCD se identificaron dos manchas con Rf similar a la quercetina, una mancha a nivel y otra por encima de la mancha del patrón.

Con respecto al análisis cromatográfico efectuado al extracto acuoso, es necesario señalar que éstas reaccionaron positivamente frente a reveladores clásicos para flavonoides, así como a la reacción de Shinoda que también es específica para dichos compuestos.

En el estudio de la especie se decidió cuantificar flavonoides totales expresados como quercetina totales, por ser metabolitos secundarios que se habían reportado con anterioridad en *C. jussieui* con múltiples propiedades farmacológicas, entre ellas, la acción antioxidante que fue la base para realizar el presente trabajo. (Landa et al. 2009, Mendiando et al. 2011)

Se comprobó la existencia de flavonoides en la droga cruda, ya que se logra compararlos con el patrón de quercetina; conjuntamente, según los colores y valores de Rf de las manchas, se comprobó que presentaron diferente composición, lo que demuestra de esta forma, una tendencia cromatográfica típico, en presencia de reveladores clásicos para estos compuestos.

Se presenció fundamentalmente un ligero eritema en un animal y moderado en los otros dos, (Figura 1 y 2) además de un ligero edema del área de aplicación en los tres animales. A las 24 h de aplicación el edema solo se observó en un animal y el eritema en general disminuyó en intensidad, de moderado a leve (Figura 2). A las 48 h post-tratamiento ocurrió una recuperación total de las lesiones observadas, verificadas hasta las 72 h que se dio por terminada las observaciones del ensayo, lo que evidenció la reversibilidad de los efectos mostrados. No se observaron otros signos, ni síntomas de toxicidad en ningún animal en ensayo.

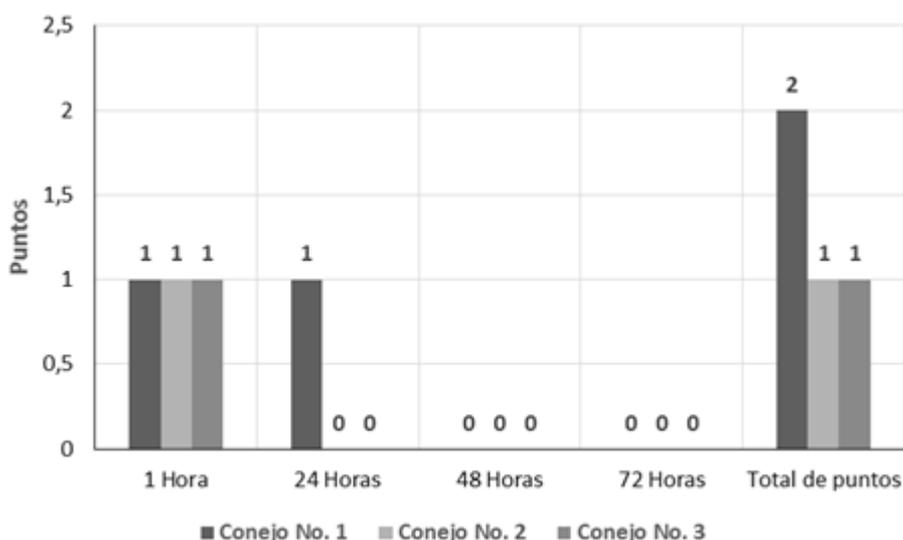


Figura 1. Evolución del edema en los conejos tratados con el extracto acuoso de *C. jussieui*

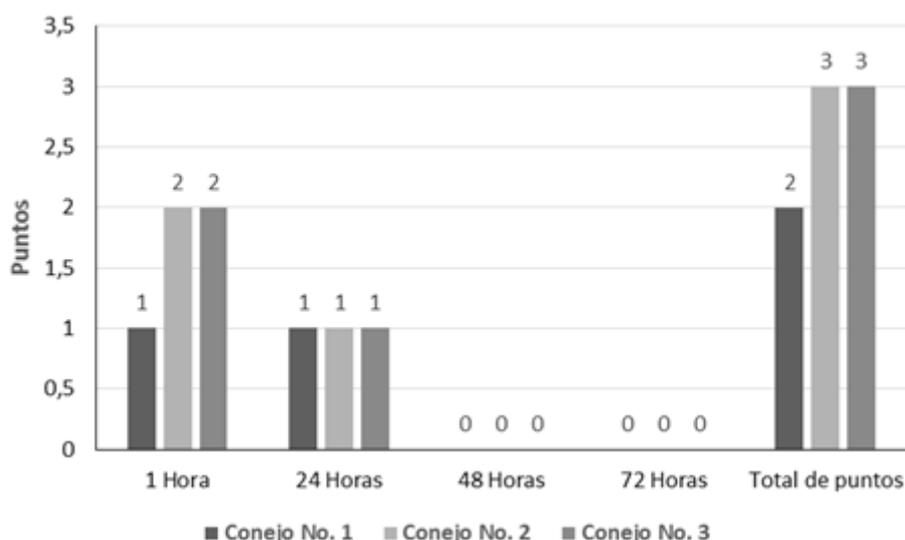


Figura 2. Evolución del eritema en los conejos tratados con el extracto acuoso de *C. jussieui*

El pH del extracto acuoso de *C. jussieui* fue de 6,8, lo que permite clasificarlo como no corrosivo con un valor cercano al neutro.

Se apreció que las alteraciones presentadas en los ojos fueron leves y rápidamente transitorias, es decir, solo se observó ligera congestión de la conjuntiva

ocular que desapareció entre las 24 y 48 horas posteriores al tratamiento (Tabla 2). Debido a la levedad de las alteraciones presentadas por los animales en estudio y a la rápida recuperación de las mismas no fue necesario extender el período de observación hasta los 15 días post-aplicación.

Tabla 2. Resultados de irritabilidad oftálmica a dosis única del extracto acuoso de *C. jussieui* en conejos

Animal	Estructura	1			24			48			72			Total de puntos
		Hora			Horas			Horas			Horas			
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	Córnea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	Conjuntiva	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Iris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	Córnea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	Conjuntiva	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Iris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	Córnea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	Conjuntiva	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Iris	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

El resultado del cálculo del Índice de Irritabilidad Ocular (IIO) de 0,8 para el extracto acuoso de *C. jussieui*, permite clasificar al mismo como No Irritante Oftálmico, según la propuesta de clasificación de la OECD/OCDE 405 (2012)

En el ensayo de sensibilización en curieles Hartley, no se encontró la presentación de edemas ni eritemas durante el período de observación de 72 h por lo que se clasificó como no sensibilizante dérmico, según OECD 406 (1992)

CONCLUSIONES

1. La determinación de los parámetros físico-químicos de control de la calidad de la droga cruda de *C. jussieui* corroboró que los valores medios obtenidos estaban dentro de los límites generales admitidos para drogas oficiales.

2. El tamizaje fitoquímico aportó presencia de flavonoides, alcaloides, saponinas, triterpenos y/o esteroides, taninos pirocatecólicos y fenoles.

3. El producto obtenido posee clasificación como no irritante dérmico y oftálmico.

4. El extracto acuoso de *C. jussieui* se clasificó como no sensibilizante dérmico.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a SENESCYT de Ecuador por el apoyo y el financiamiento de esta investigación y al Centro de Bioactivos Químicos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberto, M.R.; I.C. Zampini; M.I. Isla: Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Puna. *Braz J Med Biol Res.* 42(9), 787-90, 2009.
2. Casado, R.A.; A. Landa; J. Calvo; J.M. García-Mina: Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. *Pharm Biol.* 49(6): 620-6, 2011.
3. ECETOC. 1990. Monograph 14 “Eye irritation”. Brussels, Belgium, Actualizado, 1999.
4. Flagg, M.L.; S. Valcic; G. Montenegro; M. Gomez; B.N. Timmermann: Pentacyclic triterpenes from *Chuquiraga ulicina*. *Phytochemistry* 52(7), 1345-50, 1999.
5. Landa, A.; R. Casado; M.I. Calvo: Identification and quantification of flavonoids from *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae). *Nat Prod Commun.* 4(10), 1353-5, 2009.
6. Mendiondo, M.E.; B.E. Juarez; C. Zampini; M.I. Isla; R. Ordoñez: Bioactivities of *Chuquiraga straminea sandwith*. *Nat Prod Commun.* 6(7): 965-8, 2011.
7. Mora, C.; E. Galeano; A. Osorio: Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia I. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. 2013.
8. Norma Ramal. NRSP 309. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo. 16-20. 1992, Cuba.
9. Norma Ramal. NRSP 312. Medicamentos de origen vegetal. Extracto fluido y tinturas. Método de ensayo. 15-19. 1992.
10. OECD/OCDE 405. Acute eye irritation/corrosion. 2002.
11. OECD 406. 1981. Skin sensitization. Updated. 1992.
12. OECD 404. Acute dermal irritation/corrosion. 2002.
13. Tanko, H.M.; D.J. Carrier; S. Sokhansanj; G. Crowe: Drying of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) Canadian biosystems engineering; 47, 357-361. 2005.
14. Villagrán, C.; M. Romo; V. Castro: Etnobotánica del sur de los Andes de la primera región de Chile: un enlace entre las culturas altiplánicas y las de quebradas altas del Loa superior. *Chungará* .35, 73-124. 2003.
15. Zampini, I.C.; S. Cuello; M.R. Alberto; R.M. Ordoñez; R. D’Almeida; E. Solorzano; M.I. Isla: Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna against sensitive and multi-resistant bacteria” *J. Ethnopharmacol.* 124(3): 499-505, 2009.

Recibido: 19/11/2013

Aceptado: 11/03/2014