

## Actividad antiinflamatoria de $\delta$ -amirona y 4',7-dimetoxiapigenina aislados de *Alnus acuminata*

Ahmed M. Salama\* e Inés Yamile Avendaño

### Resumen

El presente trabajo determinó el efecto antiinflamatorio de  $\delta$ -amirona (olean-13(18)-en-3-ona) y 4',7-dimetoxiapigenina (5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona), aislados de *Alnus acuminata* (Betulaceae), por el método del edema plantar en ratas hembras, en dosis de 30, 60 y 100 mg/Kg y de 30, 60 y 80 mg/Kg respectivamente. Ambas sustancias mostraron una actividad antiinflamatoria significativa. El efecto más alto de  $\delta$ -amirona se presentó a la primera hora en las tres dosis ensayadas comparable con el efecto antiinflamatorio obtenido a las tres horas con el patrón indometacina en la dosis de 5 mg/Kg, mientras que el mejor efecto de 4',7-dimetoxi-apigenina se observó a la tercera hora, en las tres dosis ensayadas, siendo de un nivel comparable en las dosis de 60 y 80 mg/Kg al presentado por el patrón indometacina en la dosis de 5 mg/Kg.

**Palabras clave:** Actividad Antiinflamatoria -  $\delta$ -amirona - 4',7-dimetoxiapigenina - *Alnus acuminata*.

### Summary

#### Anti-inflammatory activity of $\delta$ -amyrone and Apigenin-4',7-dimethylether isolated from *Alnus acuminata*

Anti-inflammatory activity was determined for the  $\delta$ -amyrone (Olean-13(18)-en-3-one) and apigenin-4',7-dimethylether (5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone), which were isolated from *Alnus acuminata* (Betulaceae), by the carrageenan-induced rat paw edema method in female rats, in the doses of 30, 60 and 100 mg/Kg and 30, 60 and 80 mg/Kg respectively. Both substances exhibited significant anti-inflammatory activity. The highest effect of  $\delta$ -amyrone has shown at the first hour in the three assayed doses, similar to the effect presented by the standard indomethacine in a dose of 5 mg/Kg, whereas the highest effect of apigenin-4',7-dimethylether was observed at the third hour of the carrageenan administration in the assayed doses. The effects of the doses of 60 and 80 mg/Kg are comparable to the effect presented by the indomethacine in a dose of 5 mg/Kg.

**Key words:** Anti-inflammatory activity -  $\delta$ -amyrone - 4',7-dimethoxyapigenin - *Alnus acuminata*.

### Introducción

*Alnus acuminata* es una planta con numerosos usos medicinales, entre ellos se puede mencionar su uso contra el reumatismo, como cataplasma antiinflamatorio y astringente (1). Su extracto

etanólico y acuoso mostró actividad abortiva y antifertilidad en ratas y cobayos que se atribuye a la presencia de compuestos triterpénicos, esteroidales y flavonoides (2). De la fracción clorofórmica

Recibido para evaluación: abril 4 de 2005  
Aceptado para publicación: agosto 15 de 2005

\* Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá, D.C., Colombia. E-mail: amsalama@unal.edu.co

del extracto alcohólico de las hojas, el cual mostró actividad abortiva en ratones, se aislaron los compuestos Olean-13(18)-en-3-ona ( $\delta$ -amirona) y 4',7-dimetoxiapigenina (5-hidroxi-4',7-dimetoxi-flavona) y un alcohol alifático no identificado (3).

Según la literatura  $\delta$ -amirona fue aislada también de *A. fruticosa*, *A. hirsuta*, *A. japonica*, *A. glutinosa*, *A. kamschatica*, *A. manshurica* y *Cissus quadrangularis* (Betulaceae) y *Euphorbia escula* (Euphorbiaceae) (3). A su vez, 4',7-dimetoxi-apigenina fue aislada de *A. japonica* (1, 3, 4), *Boesenbergia pandurata* (5), *Epimedium sagittatum* (6), *Saussurea japonica* (7) y *Lethedon tannaensis* (8) y mostró un efecto citotóxico contra leucemia murina (P-388) y carcinoma de nasofaringe humano (KB) (8).

## Parte experimental

Muestras de  $\delta$ -amirona y 4',7-dimetoxiapigenina empleadas en este estudio fueron aisladas de las hojas de *A. acuminata* e identificadas plenamente por métodos químicos y espectroscópicos (3).

### Actividad antiinflamatoria

Esta actividad fue verificada empleando el método de edema plantar en ratas (9) contra una muestra estándar de indometacina, el vehículo [Tween 80 - agua (20: 80)] como control y agua como blanco. Se emplearon ratas hembras Wistar con peso corporal de  $180 \pm 20$  g que fueron acondicionadas por 5 días.  $\delta$ -amirona en dosis de 30, 60 y 100 mg/Kg y 4',7-dimetoxi-apigenina en dosis de 30, 60 y 80 mg/Kg fueron administrados por vía oral en 1mL del vehículo y agua hasta 40 mL/kg de peso, para que la hidratación en la rata fuera uniforme y minimizar la respuesta edematosa en la pata de

la rata. Grupos de 3 animales cada uno fueron empleados para cada dosis, el patrón indometacina en dosis de 5 mg/Kg, el vehículo [Tween 80-Agua (20:80)] y agua como blanco.

Una hora después de la administración de las sustancias, la pata de la rata fue sumergida en el pletismómetro hasta la zona señalada y se determinó el volumen de mercurio desplazado por triplicado. Simultáneamente el estado de inflamación fue inducido por la inyección de 0.05 mL de una suspensión recién preparada de carragenina al 1 % en solución salina (agente flogístico), en la zona metatarsiana de la pata de la rata.

A una, tres y cinco horas después de la administración de la carragenina, el volumen desplazado por la pata de la rata fue medido por triplicado y el promedio de la medida fue obtenido. Los datos de la actividad antiinflamatoria fueron analizados empleando el análisis de variancia (ANOVA) y los promedios del grupo se consideraron estadísticamente significante si  $p < 0.05$ .

## Resultados y Discusión

Para medir la actividad antiinflamatoria de los compuestos objeto de estudio, fue necesario asegurar que el vehículo [Tween 80-agua (20:80)] no mostrara actividad en cada grupo de ratas. Los resultados mostraron una relación Tween 80-Agua/agua mayor a uno, trayendo como consecuencia una media de porcentaje de inhibición de la inflamación menor a cero al aplicar la fórmula correspondiente y evidenciando el 100 % de la inflamación. Se observó la máxima inflamación a las tres horas, lo que coincide con los estudios que indican un mayor efecto de la carragenina entre tres y cinco horas de su aplicación (10).

La actividad antiinflamatoria del patrón indometacina se evaluó en agua y en el vehículo

[Tween 80: Agua (20:80)], mostrando una variación en su efecto con respecto al tiempo en ambos solventes debido a su mayor solubilidad en Tween 80-agua que en el agua. Como consecuencia, mostró un efecto más retardado en el agua y una media de porcentaje de inhibición menor a la primera hora ( $22,0 \pm 9,3$  %) y tercera hora ( $40,9 \pm 16,0$  %), en comparación con la obtenida a la quinta hora ( $65,8 \pm 19,9$  %) después de la administración de la carragenina. Por el contrario, debido a la mayor solubilidad de la indometacina en el vehículo Tween-Agua, se manifestó un efecto antiinflamatorio más rápido y por consiguiente presentó una media de porcentaje de inhibición más alto a la primera y tercera hora ( $45,4 \pm 23,4$  % y  $64,3 \pm 12,4$  %) respectivamente, decreciendo a la quinta hora de la administración de la carragenina, con una media de porcentaje de inhibición de  $48,0 \pm 11,9$  %.

Los resultados de la actividad antiinflamatoria de 4',7-dimetoxiapigenina mostraron una relación directa entre dosis y efecto manifestando un aumento de la media de porcentaje de inhibición de la inflamación de  $26,7 \pm 0,0$  %,  $34,6 \pm 7,4$  % y  $31,8 \pm 6,9$  % en la dosis de 30 mg/Kg a  $57,8 \pm 6,3$  %,  $73,7 \pm 5,5$  % y  $63,4 \pm 4,6$  % en la dosis de 60 mg/Kg para luego mantenerse con  $52,8 \pm 3,9$  %,  $69,9 \pm 2,4$  % y  $56,4 \pm 3,6$  % en la dosis de 80 mg/Kg, a la primera, tercera y quinta hora respectivamente (Tabla 1 y Figura 1).

También los resultados manifestaron una relación efecto-tiempo en las dosis evaluadas, en donde se evidencia un aumento de la media de porcentaje de inhibición de la inflamación

hasta la tercera hora, que luego ligeramente se disminuye a la quinta hora de la administración de la carragenina, hallándose un incremento del porcentaje de la actividad antiinflamatoria de  $26,7 \pm 0,0$  % a  $34,6 \pm 7,4$  %, a la primera y tercera hora respectivamente, que luego se reduce a  $31,8 \pm 6,9$  % a la quinta hora en la dosis de 30 mg/Kg; un incremento de  $57,8 \pm 6,3$  % a  $73,7 \pm 5,5$  % a la primera y la tercera hora, en comparación con  $63,4 \pm 4,6$  % a la quinta hora en la dosis de 60 mg/Kg y un incremento de  $52,8 \pm 3,9$  % a  $69,9 \pm 2,4$  % de la primera a la tercera hora, comparado con un  $56,4 \pm 3,6$  % a la quinta hora de la administración de la carragenina en la dosis de 80 mg/Kg. El patrón de indometacina en la dosis de 5 mg/Kg también presenta un efecto creciente de la primera a la tercera hora con resultados de  $45,4 \pm 23,4$  % y  $64,3 \pm 12,4$  % respectivamente, que luego tiende a decrecer en la quinta hora con un porcentaje de  $48,0 \pm 11,9$  %, presentando su máximo efecto a la tercera hora al igual que 4',7-dimetoxiapigenina (Tabla 1 y Figura 1).

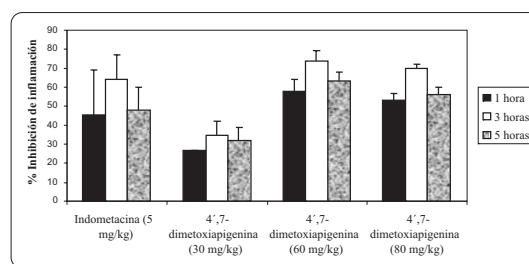


Figura 1. Actividad Antiinflamatoria de 4', 7-dimetoxiapigenina.

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria de 4',7-dimetoxiapigenina y  $\delta$ -amirona contra indometacina.

Tiempo	Compuestos		Indometacina				$\delta$ -amirona			4', 7-dimetoxiapigenina		
	5 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	100 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	80 mg/kg	30 mg/kg	60 mg/kg	80 mg/kg		
1 hora	45,4±23,4	63,3±2,7	68,9±11,2	69,3±13,6	26,7±0,0	57,8±6,3	52,8±3,9	26,7±0,0	57,8±6,3	52,8±3,9		
3 horas	64,3±12,4	44,4±9,4	45,5±4,1	50,9±4,5	34,6±7,4	73,7±5,5	69,9±2,4	34,6±7,4	73,7±5,5	69,9±2,4		
5 horas	48,0±11,9	40,1±12,6	34,8±4,7	35,7±4,6	31,8±6,9	63,4±4,6	56,4±3,6	31,8±6,9	63,4±4,6	56,4±3,6		

En las tres dosis ensayadas de 30, 60 y 100 mg/Kg de  $\delta$ -amirona se observó un efecto rápido como se refleja las medias de porcentaje de inhibición de la inflamación presentada de  $63,3 \pm 2,7\%$ , de  $68,9 \pm 11,2\%$  y de  $69,3 \pm 13,6\%$ , a la primera hora respectivamente, en comparación con las medias de porcentaje de inhibición de la inflamación de  $44,4 \pm 9,4$ ,  $45,5 \pm 4,1$  y  $50,9 \pm 4,5\%$  encontradas a la tercera hora respectivamente y  $40,1 \pm 12,6$ ,  $34,8 \pm 4,7$  y  $35,7 \pm 4,6\%$  a la quinta hora respectivamente, mostrando una disminución del efecto a medida que pasa el tiempo diferente a lo observado con 4',7-dimetoxiapigenina y la indometacina, lo cual indica que  $\delta$ -amirona puede producir efecto rápido o instantáneo que puede servir en el tratamiento de casos de inflamación aguda (Tabla 1 y Figura 2).

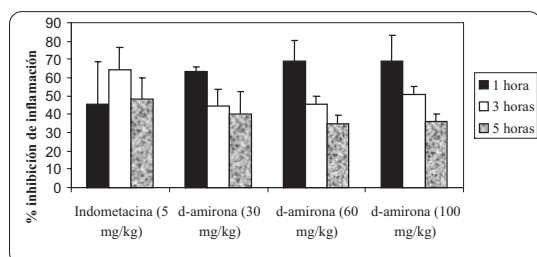


Figura 2. Actividad Antiinflamatoria de  $\delta$ -amirona.

Se observó que existe una relación directa entre la dosis y efecto, ya que el efecto antiinflamatorio se aumenta hasta alrededor de la dosis de 60 mg/Kg y se mantiene en las dosis superiores hasta la máxima dosis ensayada de 100 mg/Kg; así lo confirman los resultados, hallándose un aumento de la media de porcentaje de inhibición de  $63,3 \pm 2,7$ ,  $44,4 \pm 9,4$  y  $40,1 \pm 12,6\%$  en la dosis de 30mg/Kg a una hora, 3 y 5 horas respectivamente, a  $68,9 \pm 11,2$ ,  $45,5 \pm 4,1$  y  $34,8 \pm 4,7\%$  en las dosis de 60 mg/Kg a una hora, 3 y 5 horas respectivamente, y manteniéndose en  $69,3 \pm 13,6$ ,  $50,9 \pm 4,5$  y  $35,7 \pm 4,6\%$  en la dosis

de 100 mg/Kg a una hora, 3 y 5 horas respectivamente de la administración de carragenina (Tabla 1 y Figura 2).

Los resultados muestran una actividad de  $\delta$ -amirona distinta a la de la indometacina, como se observa en la Tabla 1 y Figura 2, ya que  $\delta$ -amirona mostró un efecto máximo a la primera hora luego de la administración de la carragenina en todas las dosis evaluadas con un decremento en relación con el tiempo, mientras que la indometacina en dosis de 5 mg/Kg demostró una actividad mayor a la tercera hora de la inducción de la inflamación, tiempo en el cual la carragenina (que es el agente flogístico) empieza a demostrar su mayor efecto inflamatorio y disminuyendo a la quinta hora según los resultados obtenidos, lo cual indica un efecto más rápido de  $\delta$ -amirona, debido quizás a una mayor y más rápida absorción en el organismo siendo esto consecuencia de su naturaleza química triterpénica que le dan características apolares.

La estructura molecular de la indometacina presenta diferentes elementos electronegativos como son el nitrógeno, oxígeno y cloro, que le dan características polares por su capacidad de formar puentes de hidrógeno por lo que se retarda más su absorción y por ende el resultado de su efecto, siendo esta la causa de su máxima actividad antiinflamatoria a las tres horas; los grupos funcionales como el grupo carboxilo en la posición 3 que le confiere acidez y mayor potencia antirreumática, el grupo arilacilo en la posición 1, el metoxilo en la posición 5 y presencia del halógeno en la posición *para* del grupo 1-benzofilo, son en gran parte los responsables de su actividad antiinflamatoria (11).

También se observó una actividad creciente de 4',7-dimetoxiapigenina, de la primera a la tercera hora, teniendo su máximo efecto a la tercera hora de la administración de la carragenina, al igual que la indometacina como se

puede observar en la Tabla 1 y Figura 1, esto sucede gracias a los grupos ceto, hidroxilo y metoxilo presentes en la molécula que le confieren propiedades polares, por lo cual su máximo efecto se retarda debido a una absorción más lenta que en el caso de  $\delta$ -amirona.

La actividad antiinflamatoria de 4',7-dimetoxiapigenina y  $\delta$ -amirona confirma y da un soporte científico al uso de *Alnus acuminata* en la medicina tradicional para el tratamiento del reumatismo y como cataplasma antiinflamatorio (1).

### Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por las instalaciones del Laboratorio de Fitoquímica y del Bioterio de experimentación.

### Bibliografía

1. H.Y. Bernal y J. E. Correa, Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Programa de Recursos Vegetales del Convenio Andrés Bello, PREVECAB. Tomo II. Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello, SECAB. Bogotá, Colombia, 1989, p. 126.
2. A.M. Salama, M. Gallego, C. Barrera y E. Espinel, Composición química y actividad abortiva de las hojas de *Alnus acuminata*, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **15**, 51 (1988).
3. A.M. Salama, J. Rincón, M.A. Torres y C. Iregui, Efecto abortivo, aislamiento e identificación de principios activos de *Alnus acuminata*, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **25**, 36 (1996).
4. E. Wollenweber, Pure methoxy flavonoids from buds of *Betula nigra*, *Phytochemistry*, **15**, 438 (1976).
5. T. Jaipetch, V. Reutrakul, P. Tuntiwachwuttikul y T. Santisuk, Flavonoids in the black rhizomes of *Boesenbergia pandurata*, *Phytochemistry*, **22**, 625 (1983).
6. C. Chen, Y.L. Huang, C.M. Sun y C.C. Shen, New Prenylflavones from the leaves of *Epimedium sagittatum*, *J. Nat. Prod.*, **59**, 412 (1996).
7. Y.H. Kuo, S.T. Way y C.H. Wu, A new Triterpene and new Lignan from *Saussurea japonica*, *J. Nat. Prod.*, **59**, 622 (1996).
8. A. Zahir, A. Jossang, B. Bodo, J. Provost, J.P. Cosson y T. Sévenet, DNA Topoisomerase I Inhibitors: Cytotoxic Flavones from *Lethedon tannaensis*, *J. Nat. Prod.*, **59**, 701 (1996).
9. A. Winter, E.A. Risley y G.W. Nuss, Carrageenin-induced edema in hind paw of the rats an assay for anti-inflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544 (1962). Vía Manual de Técnicas de Investigación, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo CYTED, 1995.
10. M.E. Gerritsen, W.W. Carley, G.E. Ranges, C.P. Shen, S.A. Phan, G.F. Ligon y C.A. Perry, Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expresión, *Am. J. Pathol.*, **147**, 235 (1995).
11. W.O. Foyé, Principios de Química Farmacéutica. Editorial Reverté. Barcelona, España, 1984, p. 587.