
¿Y DE INVESTIGACIÓN QUÉ?

VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO DE KALANCHOE PINNATA (LAM.) PERS EN MODELO ANIMAL DE INFLAMACIÓN INDUCIDA EN PATA DE RATA POR LAMBDA-CARRAGENINA.

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF KALANCHOE PINNATA (LAM.) EXTRACT IN CARRAGEENAN-INDUCED RAT PAW OEDEMA MODEL.

Diana Fernanda Donoso García, Sandra Arévalo Niño, Mónica Andrea Villamil Angarita* Paola Borrego Muñoz**, Antonio Luis Mejía Piñeros**, Luis Miguel Pombo Ospina**

Recibido Feb 3-2013. Aceptado Julio 6-2013

RESUMEN

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. es una planta popular que se emplea en medicina tradicional en muchas partes del mundo y en especial en Suramérica. Estudios previos de la especie han reportado actividad antialérgica, antileishmaniasis, antiinflamatoria, cicatrizante, colerética, antidiabética y anti-nociceptiva. Químicamente se ha reportado la presencia de alcaloides, glucósidos, flavonoides, saponinas y taninos. Este estudio busca evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico completo de la especie *Kalanchoe pinnata* en modelo animal de inflamación inducida en pata de rata con lambda-carragenina. La valoración del efecto antiinflamatorio se evaluó mediante el modelo de inflamación inducida en pata de rata por lambda-carragenina, utilizando la técnica de ple-tismometría para efectuar las mediciones. En este estudio se demostró el efecto antiinflamatorio de los extractos etanólicos completos de *Kalanchoe pinnata* y *Calendula officinalis* a dosis de 300 mg/kg, administrados por vía intraperitoneal, mostrando porcentajes netos de inhibición de la inflamación de 48,19% y 60.01%, respectivamente. **REC 2013; 19: 79-85**

Palabras claves: *Kalanchoe pinnata*, inflamación, actividad antiinflamatoria, Crassulaceae

INTRODUCCIÓN

La inflamación puede ser inducida por diversos estímulos, dentro de los cuales se encuentra el daño físico, precursores químicos, invasión microbiana, respuesta inmune primaria o por combinación variable de estos estímulos. En términos generales, la inflamación controlada es beneficiosa. Si la regulación es disfuncional, se generan una serie de reacciones en cadena que pueden progresar a la

SUMMARY

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers. is a popular plant used in folk medicine in many places around the world, especially in South America. Previous studies have reported antiallergic, antileishmaniasis, anti-inflammatory, healing, choleric, anti-diabetic and anti-nociceptive activity. Phytochemical studies have showed the presence of alkaloids, glycosides, flavonoids, saponins and tannins. This research aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of crude ethanol extract taken from *Kalanchoe pinnata* in animal model of induced inflammation in rat paw with lambda-carrageenan. The assessment of the anti-inflammatory effect was carried out by using the model of induced inflammation in rat paw by lambda-carrageenan, by means of the plethysmometry technique for measurement. In this study, the anti-inflammatory effect of crude ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* and *Calendula officinalis* was proved at doses of 300 mg / kg, administered intraperitoneally, showing net percentages of inhibition of inflammation of 48.19% and 60.01%, respectively. **REC 2013; 19: 79-85**

Keywords: *Kalanchoe pinnata*, inflammation, anti-inflammatory, Crassulaceae

inflamación crónica, con la consecuente degeneración celular excesiva, exudación, necrosis, o la formación de granulación anormal; que finalmente desencadenan en diferentes grados de lesión tisular. En el manejo de esas lesiones tisulares es vital tener en cuenta factores como el tipo de tejido afectado, el agente causante de la infección, la inflamación asociada, la humedad de la zona afectada y el borde de la herida. Alrededor del tema

*Especialistas en Terapéuticas Alternativas y Farmacología Vegetal. Fundación Universitaria Juan N. Corpas.

** Investigadores de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas. Grupo de Investigación en Farmacología Vegetal y Terapéuticas Alternativas.

Correspondencia: Luis Miguel Pombo Ospina; miguel.pombo@juanncorpas.edu.co

existen guías de manejo cuyos principios básicos se han mantenido durante los últimos 10 años, con algunas modificaciones derivadas de la implementación de nuevos conocimientos. El manejo eficiente de los procesos inflamatorios asociados es fundamental en la reparación tisular y en la prevención de la inflamación crónica^(1,2). Debido a que la inflamación implica muchos mediadores y rutas que conducen a una amplia gama de cambios en la patología, resulta complejo identificar los blancos moleculares específicos en el tratamiento de la inflamación.

Dentro de las opciones terapéuticas desarrolladas para intervenir el proceso inflamatorio en el ámbito clínico disponemos actualmente de fármacos antiinflamatorios: dentro de los más utilizados figuran los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y los corticoesteroides, infortunadamente para ambos grupos de fármacos se presentan efectos secundarios de considerable impacto⁽¹⁾. Los AINES son ampliamente empleados para el tratamiento sintomático del dolor agudo y de enfermedades inflamatorias crónicas; sin embargo, su uso se ha restringido debido a las complicaciones gastrointestinales tales como perforaciones por úlcera péptica, obstrucciones y sangrado. El uso de AINES ha sido asociado con un aumento de tres a cinco veces el riesgo de complicaciones gastrointestinales. Estudios clínicos han mostrado que ese riesgo disminuye con el uso de medicamentos inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa (COX)-2, pero que estos últimos se asocian con el incremento de eventos cardiovasculares serios⁽³⁾.

El estudio de la flora medicinal colombiana, es de gran interés y permite la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la inflamación, que incluyen especies que podrían atacar diferentes blancos moleculares implicados en los procesos inflamatorios de manera simultánea, disminuir los efectos secundarios y aumentar la eficacia. Lo anterior se explica por la presencia de un gran número de metabolitos secundarios de amplia diversidad estructural.

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers es una planta popular que se emplea en medicina tradicional en muchas partes del mundo y en especial en Sura-

mérica. En Guyana, tradicionalmente se usan las hojas como antiinflamatorio y antiséptico para el tratamiento de la tos, úlceras y heridas⁽⁴⁾. Estudios previos de la especie han reportado actividad antialérgica⁽⁵⁾, antileishmaniasis⁽⁶⁾, antiinflamatoria⁽⁷⁾, cicatrizante⁽⁸⁾, colerética, antidiabética y antinociceptiva⁽⁹⁾. En Bangladesh, la medicina tradicional reporta el uso de preparados a partir de la planta, en el tratamiento de artritis reumatoide y dolores de hueso⁽¹⁰⁾. Químicamente se ha reportado la presencia de alcaloides, glucósidos, flavonoides, saponinas y taninos⁽¹¹⁾.

Este estudio busca evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico completo de la especie *Kalanchoe pinnata* en modelo animal de inflamación inducida en pata de rata con lambda-carragenina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Kalanchoe pinnata fue recolectada en el departamento de Boyacá, municipio de Villa de Leyva, carretera a Santa Sofía. 2000 msnm, bosque seco, borde del camino. La planta fue determinada en el Herbario Nacional Colombiano con el número de colección 559431.

Obtención de los extractos

20 kg de las hojas frescas de *Kalanchoe pinnata* fueron sometidas a un proceso de secado por convección forzada a una temperatura de 60°C. Posteriormente, las hojas secas fueron molidas en un molino de bolas, hasta obtener un polvo fino (8kg). El material vegetal seco y pulverizado fue extraído con 24 L de etanol al 96%, en un percolador con recirculación por un periodo de 10 días. El extracto completo fue concentrado al vacío, en un Rotaevaporador (Büchi), hasta obtener un extracto libre de alcohol. El resultado de la evaporación fue liofilizado, obteniéndose así 27 g de polvo homogéneo.

El extracto de *Calendula officinalis* fue obtenido mediante un proceso de evaporación a presión reducida de una tintura (1:5) de las flores de la planta.

Animales de experimentación

Para el estudio fueron empleadas ratas Wistar suizas albinas hembras con un peso corporal entre 150 a 200 g. Los animales fueron obtenidos en el Instituto Nacional de Salud. Todos los animales fueron dispuestos en cajas estándar a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los animales fueron alimentados con alimento balanceado (LabDiet) y agua *ad libitum*. Antes de la administración de los tratamientos, los animales se dejaron en ayuno por 12 h con libre acceso al agua.

Medicamentos y reactivos

La lambda carragenina fue obtenida de Sigma-Aldrich y el diclofenaco utilizado fue el medicamento genérico. Los solventes de extracción y de solubilización de las muestras fueron proporcionados por proveedores de la firma Merck.

Actividad antiinflamatoria

Edema en pata de rata inducido por carragenina.

Veinte ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 4 grupos de 5 animales cada uno. Los animales de experimentación fueron sometidos a 12 h de ayuno y se les retiró el agua únicamente durante el tiempo del experimento. Se limitó el consumo de agua con el fin de garantizar uniformidad en la hidratación y para minimizar la variabilidad en la respuesta edematosa. La inflamación de la pata derecha de cada rata, fue inducida mediante la inyección de 0,1 mL de una solución de lambda-carragenina al 1%, en la aponeurosis plantar. El grupo I fue tratado con el extracto completo de Kalanchoe a una concentración de 300 mg/kg. Al grupo II se le administró el extracto completo de Caléndula a una dosis 300 mg/kg. El grupo III, se utilizó como control positivo y se le administró diclofenaco a una dosis de 100 mg/kg, y al grupo IV se le administró solución salina (grupo control negativo). Todos los tratamientos fueron administrados por vía intraperitoneal. La medida del volumen de la pata derecha inflamada se realizó por inmersión utilizando un pletismómetro marca Ugo Basile, modelo 7140^(12,13). Las mediciones se hicieron por duplicado y se registraron 1,3,5 y 7 horas después del inicio del experimento. El porcentaje de inflamación fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Donde, V_t es el volumen de la pata inflamada a un tiempo determinado y V_0 es el volumen normal de la pata, en el tiempo inicial.

El porcentaje de inhibición fue calculado mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{X_{\text{control}} - X_{\text{grupo}}}{X_{\text{control}}} \times 100$$

Donde, X_{control} es el porcentaje de inflamación promedio del grupo control negativo a un tiempo determinado y X_{grupo} es el porcentaje de inflamación promedio de un grupo sometido a tratamiento con un extracto específico a un tiempo determinado.

Adicionalmente, el porcentaje neto de inhibición se calculó obteniendo el área bajo la curva de inflamación vs. tiempo.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM (Error estándar de la media). Para determinar las diferencias entre los diferentes grupos se realizó un análisis de varianza a doble vía y la prueba de significancia para comparaciones múltiples de Bonferroni. Una $p < 0,05$ fue considerada como significativa. Para el análisis se empleó el programa GraphPad Prism 5.0.

Consideraciones éticas

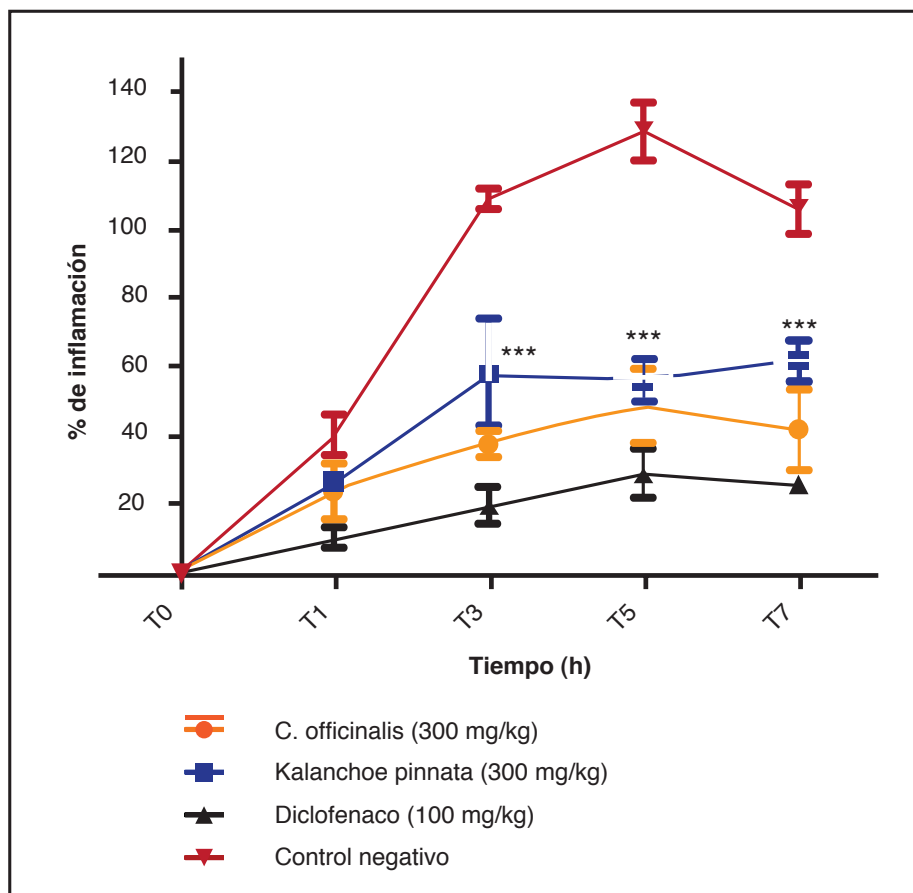
Los animales fueron manejados según los criterios éticos y protocolos de manejo de animales de experimentación según la OECD documento 404⁽¹⁴⁾.

RESULTADOS

En este estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto de *Kalanchoe pinnata* con el modelo de inflamación inducida con lambda-carragenina en pata de rata y se comparó con el diclofenaco, fármaco antiinflamatorio no esteroideo de uso frecuente y con el extracto de *Caléndula officinalis*, especie vegetal reconocida por su uso como antiinflamatorio.

En la figura 1 se muestra el efecto antiinflamatorio del extracto completo de *Kalanchoe pinnata* como porcentaje de inflamación, a los diferentes tiempos de experimentación. El efecto antiinflamatorio de *Kalanchoe pinnata* expresado como porcentaje de inflamación a la tercera hora de experimentación fue de 57,77% y se mantiene hasta la séptima hora del estudio, mostrando en estos tiempo diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control negativo, $P < 0,0001$. A pesar de que se observa un menor porcentaje de inflamación para el extracto completo de Caléndula, las diferencias con respecto al extracto de Kalanchoe, en todos los tiempos considerados en el estudio, no son estadísticamente significativas, $P > 0,05$. La comparación del efecto antiinflamatorio de Kalanchoe y de diclofenaco, no produjo diferencias estadísticamente significativas a la primera y quinta hora de experimentación ($P > 0,05$), tiempos en donde el efecto antiinflamatorio es similar.

Figura 1. Efecto antiinflamatorio del extracto de *Kalanchoe pinnata* sobre el edema inducido en pata de rata con lambda-carragenina.



*** $P < 0,0001$ con respecto al grupo control negativo.

En la tabla 1 se muestran los promedios de los porcentajes de inhibición de la inflamación, en los cuatro grupos tratados, en los tiempos: 1, 3, 5 y 7 horas de experimentación. Kalanchoe presenta el mayor porcentaje de inhibición a la quinta hora después de comenzar el estudio (56,38%) y el menor valor a la primera hora de seguimiento (33,84%).

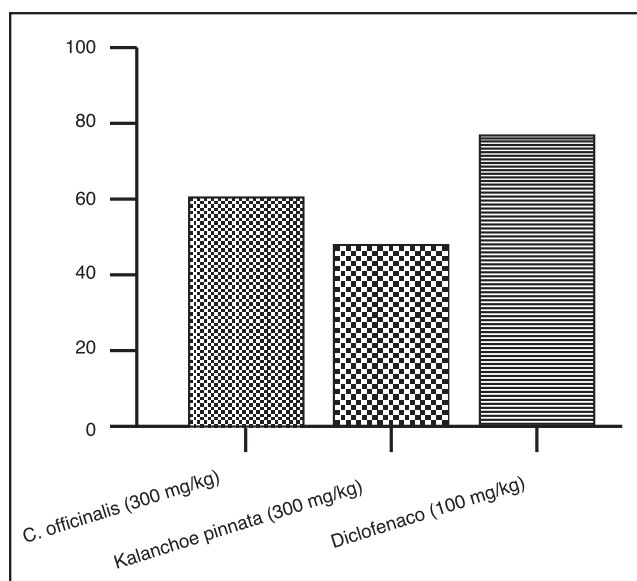
Tabla 1. Actividad antiinflamatoria del extracto completo de *Kalanchoe pinnata*, expresada como porcentaje de inhibición de la inflamación.

Tratamientos Tiempo (h)	Kalanchoe (300 mg/kg)	Caléndula (300 mg/kg)	Diclofenaco (300 mg/kg)
T0	0	0	0
T1	33,84	40,39	73,84
T3	46,89 ***	64,74	81,76
T5	56,38 ***	62,02	77,39
T7	41,75 ***	60,39	75,54

*** P<0,0001 Con respecto al grupo control negativo.

El efecto antiinflamatorio neto, calculado en el área bajo la curva de porcentaje de inflamación vs. tiempo y expresado como porcentaje de inhibición de la inflamación con respecto al grupo control negativo, es de 48,18% para el grupo tratado con el extracto completo de *Kalanchoe pinnata*, 60,01% para el grupo tratado con el extracto completo de *Calendula officinalis* y de 78,10% para el grupo tratado con diclofenaco (grupo control positivo) (Figura 2).

Figura 2. Porcentaje neto de inhibición de la inflamación de los diferentes tratamientos.



DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto completo de *Kalanchoe pinnata* a una dosis de 300 mg/kg, utilizando el método de inducción de edema plantar por inyección de lambda carragenina. Adicionalmente, se confirmó el efecto antiinflamatorio del extracto de *Calendula officinalis*. Los resultados muestran que la administración por vía intraperitoneal del extracto etanólico completo de *Kalanchoe pinnata* a una dosis de 300 mg/kg a ratas con edema plantar inducido por inyección de lambda carragenina, ejerce un efecto antiinflamatorio marcado, que se evidencia a partir de la tercera hora

de experimentación con un valor de porcentaje de inhibición neto de 48,19%. El mayor porcentaje de inhibición se observa a la quinta hora de experimentación (56,38%). Siddhartha et al, en un experimento similar, encontraron que la administración por vía intraperitoneal del extracto metanólico de las hojas de *Kalanchoe pinnata* a una dosis de 300 mg/kg, produjo un porcentaje de inhibición de 87,80% ⁽¹⁵⁾. En el presente estudio no se establecieron los mecanismos de acción del extracto de la planta estudiada, sin embargo, el autor citado reporta que el extracto metanólico inhibe la producción de histamina, serotonina, bradiquinina e hialuronidasa. Se conoce que estos mediadores de la inflamación regulan varias fases del proceso inflamatorio inducido por lambda carragenina ⁽¹⁶⁾. Esta actividad antiinflamatoria se puede explicar por el alto contenido de flavonoides en la especie estudiada, específicamente de quercetina y quercitrina ⁽¹⁷⁾. Morikawa et al demostraron que flavonoles tipo quercetina, modulan la respuesta inflamatoria, regulando la síntesis de prostanoides y la producción de citoquinas ⁽¹⁸⁾. La polaridad del solvente de extracción juega un papel importante en el efecto antiinflamatorio de *Kalanchoe pinnata*, ya que dependiendo del solvente utilizado, varía el contenido de metabolitos secundarios presentes en el extracto. En estudios anteriores, el extracto metanólico mostró mayor potencia antiinflamatoria que la obtenida en el presente estudio con

el extracto hidroalcohólico. Lo anterior, posiblemente se explica por el mayor contenido de compuestos fenólicos tipo flavonoide, en los extractos metanólicos.

Por otra parte, se confirmó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico completo de *Calendula officinalis*, a una dosis de 300 mg/kg, por vía intraperitoneal. Este extracto mostró un porcentaje neto de inhibición igual al 60,01%. Eglseer et al demostraron el efecto antiedematoso de triterpenoides aislados de la Caléndula, y encontraron que los compuestos faradiol y taraxasterol fueron los de mayor respuesta antiinflamatoria ⁽¹⁹⁾. En todos los tiempos considerados, para el extracto de Caléndula se observan mayores porcentajes de inhibición, en comparación con el extracto de *Kalanchoe*, sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($P > 0,05$).

En este estudio se demostró el efecto antiinflamatorio de los extractos etanólicos completos de *Kalanchoe pinnata* y *Calendula officinalis* en modelo de inflamación inducida en pata de rata por lambda carragenina, a dosis de 300 mg/kg, administrados por vía intraperitoneal, sin embargo, es necesario realizar estudios que permitan profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción por los cuales estos extractos modulan la respuesta inflamatoria.

BIBLIOGRAFÍA

1. QiuHong Wang, Haixue Kuang, Yang Su, Yanping Sun, Jian Feng, Rui Guo, Kelvin Chan. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2013. 146:9-39.
2. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T, Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years?. *Int Wound J.* 2012 Dec;9 Suppl 2:1-19.
3. Castellsague J, Riera-Guardia N, Calingaert B, Varas-Lorenzo C, Fourier-Reglat A, Nicotra F, et al. Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: a systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). *Drug Saf.* 2012 Dec 1;35(12):1127-46.
4. Saïda El Abdellaoui, Emilie Destandau, Alix Toribio, Claire Elfakir, Michel Lafosse, Isabelle Renimel, Patrice André, Perrine Cancellieri, Ludovic Landemarre. Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. *Anal Bioanal Chem* 2010. 398:1329-1338.
5. Cruz E, Reuter S, et al. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine*, 2012; 19: 115– 121.
6. Da Silva S, Costa S, Mendonga S, Silva E, Moraes V, Rossi-Bergmann B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*, 1995; 60: 201-210.
7. Ibrahim Te, Cunha J, Madi K, da Fonseca Lea, Costa S, Gonçalves V. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *International Immunopharmacology*, 2002; 2: 875–883.
8. Mekonnen A, Temesgen Sidamo a, KaleabAsres b, EphremEngidawork. In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 145: 638–646.

9. Ojewole JAO. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of Bryophyllum pinnatum (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005. 99:13-19.
10. Ahsan Morshed, Md. Hasibul Hossain, Shahriar Shakil, Khaleda Nahar, Shahnaz Rahman, Dilara Ferdousi, Tozammel Hos-sain, Ishtiaq Ahmad, Majeedul H. Chowdhury, Mohammed Rahmatullah. Evaluation of Antinociceptive Activity of two Bangladeshi Medicinal Plants, *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. and *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4(2): 193-197, 2010.
11. S.K. Biswas, A. Chowdhury, S.Z. Raihan, M.A. Muhit, M.A. Akbar and R. Mowla. Phytochemical investigation with assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of chloroform extract of the leaves of *Kalanchoe pinnata*. *American Journal of Plant Physiology*, 2012. 7(1):41-46.
12. G. Saltan Citoglu, Ö. Bahadır Acikara, B. Server Yilmaz, H. Özbek. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia*, 2012. 83: 81-87.
13. Cyted. *Manual de Técnicas de Investigación*, 1995. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Pg. 83 – 84.
14. OECD. 404 Oecd Guideline for the Testing of Chemicals Acute Dermal Irritation/Corrosion. Adoptada el 24 de abril de 2002.
15. Siddhartha Pal, A.K. Nag Chaudhuri. Anti-inflammatory action of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract. *Fitoterapia*, 1990.Vol. LXI, No.6.
16. Swingle K.F., in “Anti-inflammatory agents: Chemistry and Pharmacology”, Vol 2. Scherrer R.A., Whitehouse M.W. (Eds). Academic Press, New York, 1971, p33.
17. Cruz E, Da-Silva S, Muzitano M, Silva P, Costa S, Rossi-Bergmann B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock, *International Immunopharmacology* 2008; 8 : 1616–1621.
18. Keiko Morikawa, Mitsuko Nonaka, Misa Narahara, Ikuko Torii, Kiichiro Kawaguchi, Takafumi Yoshikawa, Yoshio Kumazawa, Shigeru Morikawa. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, 2003. 74:709-721.
19. K. Zitterl-Eglseer, S. Sosa, J. Jurenitsch, m. Schubert-Zsilaveez, R. Della Loggia, A. tubaro, M. Bertoldi, C. Franz. Anti-oedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 1997. 57:139-144.

IN MEMORIAM

La Fundación Universitaria Juan N Corpas y muy especialmente la Facultad de Música, lamentan profundamente la temprana desaparición del Maestro Fabio Santana Pérez, docente de la institución y le expresan a sus familiares y amigos sus sentimientos de solidaridad.