

Trabajo científico

Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo); para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria

Study of ethanolic extract of *Eryngium heterophyllum* (herb frog). To make sure its hypoglycemic and anti-inflammatory activity

Rodolfo Carreón-Sánchez, Rubén Marroquín-Segura, José Luis Alfredo Mora-Guevara, Carlos Salvador Valadez-Sánchez, Yolanda Flores-Cabrera, Maurilio Flores-Pimentel, Vicente Jesús Hernández-Abad

Laboratorio 1 PA UMIEZ, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

Resumen

Este estudio tuvo como objetivos realizar un ensayo agudo de toxicidad así como evaluar la supuesta actividad anti-inflamatoria, e hipoglucemiante del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum*, también se midieron los niveles séricos de nitritos y ceruloplasmina. Resultados. El extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* no mostró efectos tóxicos visibles en el modelo de intoxicación aguda en ratones. Tampoco mostró efecto anti-inflamatorio en el modelo agudo ni en el crónico, no se observaron diferencias en los niveles de ceruloplasmina, ni en la concentración de nitritos. Este extracto no mostró ningún efecto como hipoglucemiante. Conclusión: el extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* no debe recomendarse para su uso en diabetes ni en procesos inflamatorios como es la artritis reumatoide.

Abstract

The aim of this study was to assess an acute toxicity assay, as well as the alleged anti-inflammatory and hypoglycemiант activities of an ethanolic extract of *Eryngium heterophyllum*. Serum levels of Nitrites and ceruloplasmin were quantified too. Results. Ethanolic extract not showed any visible signs of intoxication, nor lost weight in animals after 7 days of treatment. This extract no showed any anti-inflammatory activity, in the acute and chronic models assessed. The ethanolic extract had not hypoglycemiант activity and no differences were observed in the ceruloplasmin levels or nitrite concentration, in daily administration during a week of this extract, in the statistical analysis also showed no differences between the treatment groups. Conclusion. This ethanolic extract of *Eryngium heterophyllum* should not be recommended for use in diabetes or inflammatory processes such as rheumatoid arthritis.

Palabras clave: *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo), antiinflamatorio, hipoglucemiante.

Key words: *Eryngium heterophyllum* (grass toad), anti-inflammatory, hypoglycemic treatment.

Correspondencia:

Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara
Laboratorio 1 planta alta edificio UMIEZ
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Universidad Nacional Autónoma de México
Batalla 5 de Mayo s/n esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, C.P. 09230, Delegación Iztapalapa, México, D.F.
Tel. 56230762

Fecha de recepción: 12 de noviembre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones: 16 de abril de 2013

Fecha de aceptación: 10 de junio de 2013

Introducción

En México las plantas medicinales han sido parte importante de la historia desde antes de la colonia, las plantas se han usado como medicina alternativa transmitiendo el conocimiento de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas.^{1,2} Existen personas que dominan el conocimiento empírico de las plantas medicinales, otros sólo las comercializan desconociendo sus propiedades y efectos. Dos especies de plantas de la misma familia pueden tener una gran similitud fisionómica, lo cual no significa que se puedan usar para tratar las mismas enfermedades o incluso una de ellas puede ser tóxica. Por otro lado los nombres comunes asignados para una misma planta varían según la región y la posología es al gusto de los que consumen estos productos y frecuentemente se presentan en los hospitales casos de intoxicaciones atribuidas al mal uso de las plantas medicinales, fundamentalmente debidas a la autoprescripción, desconocimiento de las especies y abuso de la dosis; el uso indiscriminado se debe a la creencia de que lo natural es sinónimo de inocuidad.³ La hierba del sapo (*Eryngium heterophyllum*), es una planta muy conocida empíricamente, se le atribuyen propiedades terapéuticas, en el tratamiento de diabetes, artritis, e hipercolesterolemia entre otras, Estudios recientes de la hierba del sapo sobre la actividad hipocolesterolémica, reportan que el extracto acuoso a una dosis de 100 mg/kg disminuyó el colesterol⁴ en un 9%. La posología empírica recomendada es consumirla en su estado natural, la parte aérea de la planta se pulveriza y se hiere en agua, esta infusión se suministra de acuerdo al padecimiento. Otra forma es la que se realiza por laboratorios especializados, la parte aérea de la planta se pulveriza y se extrae con alcohol etílico (sin calentamiento para que no pierda sus principios activos. sic) se obtiene el extracto, mismo que es envasado sin ninguna otra sustancia. No está publicado ningún estudio sobre la actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria de la hierba del sapo, por lo que consideramos necesario que se realizaran estudios sistemáticos para evaluar de manera tangible si esas actividades están presentes en la planta, debido a que sólo existen testimonios de esa supuesta actividad, ya que la planta se vende en México para tratar diabetes y artritis reumatoide.^{5,6}

Este estudio tuvo como fin el evaluar la toxicidad, actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo).

Material y métodos

Se usaron ratones machos de 25±3 g de peso para este estudio. Los animales se alimentaron con Rodent Lab Chow 5001. Agribrands Purina (México) y agua *ad libitum*. El cuidado de los animales y el manejo de las técnicas se llevaron de acuerdo

a “La Guía Para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999)”, la cual es equivalente a la European Community Guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Los animales se dejaron en ayuno de 16 h antes de su uso para todos los ensayos.

Planta. La planta fue colectada en el Valle de Zaragoza, estado de Chihuahua México, en el mes de septiembre. La planta fue clasificada y autenticada por el Dr. Robert Bye y la M en C Edelmira Linarez, del Instituto de Biología de la UNAM. Las ramas de la planta se dejaron secar, se molieron y se extrajeron con etanol, después se eliminó el disolvente usando un evaporador rotatorio con presión reducida. El producto obtenido se guardó en refrigeración con atmósfera inerte (N₂) hasta su uso.

Ensayo de Toxicidad. Ensayo agudo. El extracto etanólico de la planta *Eryngium heterophyllum* se administró a 10 ratones en una dosis única de 100 mg/Kg de peso en un volumen de 0.2 mL/30g. Se usó una sonda oral (Animal feeding needles, 20G, X 1-11/2" Poper and Sons, Inc. Newhyde Park, NJ, USA). Los animales se observaron diariamente durante 7 días para identificar efectos tóxicos como: muertes, diarrea, salivación, irritabilidad, pérdida de peso, ataxia, anestesia, etc. El grupo control negativo sólo recibió solución salina fisiológica. Al final del ensayo los animales se pesaron, se anestesiaron en cámara de éter y se sangraron a blanco por incisión axilar, los sueros obtenidos se congelaron a -20° C hasta su uso. Los hígados, riñones y bazo se extrajeron e inmediatamente se pesaron en una balanza analítica y se calcularon los pesos relativos de acuerdo a la siguiente fórmula: peso relativo del órgano = (peso del órgano/peso del animal) X 100.

Ensayo para evaluar la actividad hipoglucemianta. Se siguió la metodología de Marroquin-Segura et al.⁷ Se usaron 4 grupos de ratones de 6 animales cada grupo, a los cuales se les administró con una sonda gástrica: 0.2 mL de solución salina (testigo negativo), tolbutamida (40 mg/Kg de peso), glibenclamida (0.8 mg/kg de peso) y 100 mg/kg de peso del extracto etanólico de la planta *Eryngium heterophyllum*, en un volumen aproximado de 0.2 mL. A los ratones se les indujo una hiperglucemia temporal administrando subcutáneamente glucosa al 50% (2 g de glucosa/kg) al inicio del ensayo y a los 60 minutos. Se tomaron muestras de sangre de la parte distal de la cola y mediante un glucómetro (one touch, Johnson y Johnson) se midió la concentración de glucosa. A los tiempos 0, 60, 120 y 180 minutos.

Ensayos para evaluar la actividad anti-inflamatoria. Los ensayos para evaluar la actividad anti-inflamatoria en las fases aguda y crónica se realizaron de acuerdo a la metodología de

Marroquin-Segura R et al.⁸ Para la fase aguda se usaron tres grupos de 6 animales cada grupo. Un grupo recibió por sonda gástrica 0.2 mL de solución salina (testigo negativo), un grupo testigo positivo que recibió 10 mg/kg de peso de indometacina (Aspen Port Elizabeth (Pty) Ltd Port Elizabeth, Sudáfrica) y 100 mg/kg de peso, del extracto etanólico de la planta *Eryngium heterophyllum*. 1 h después se administro 50 μ L de carragenina al 1% (Sigma Chemical Company. cat. C3889) en el cojinete plantar. Se midió con un micrómetro (0.01mm Scala), el grosor de la pata a los tiempos 0, 1h, 2h, 3h, 4 h y 5 h. Para el ensayo crónico se formaron 3 grupos de 6 animales cada uno y se les colocó un pellet de algodón de 10 mg bajo la piel en la región escapular, los animales recibieron diariamente mediante sonda gástrica, durante 7 días: el grupo testigo negativo 0.2 mL de solución salina, el grupo testigo positivo hidrocortisona 15 mg/kg (JANSSEN-CILAG), al grupo de prueba 50 mg/kg de peso del extracto de *Eryngium heterophyllum*. Al final del ensayo los animales se anestesiaron en cámara de éter y se sangraron hasta blanco, se extrajeron los pellets, se dejaron secar a 37° C y se pesaron en una balanza analítica. Los sueros se separaron y se determinó ceruloplasmina y nitritos como una medida indirecta de la generación de óxido nítrico, también se calcularon los índices (pesos relativos), hepáticos, esplénicos y renales.

Determinación de la ceruloplasmina (CP). Los valores se obtuvieron mediante inmunodifusión radial (RID). El suero anti ceruloplasmina de ratón de conejo se obtuvo inmunizando Conejos Nueva Zelanda con CP purificada de ratón de acuerdo al método de Ehrenwald *et al.*⁹ La pureza de la ceruloplasmina se estableció mediante SDS-PAGE se inmunizaron los Conejos, se sangraron al día 45 y la IgG anti CP fue obtenida mediante DEAE Celulosa. La especificidad de la IgG anti CP fue evaluada por imunolectroforesis donde dos bandas paralelas aparecieron en la región α globulina que corresponden a la CPI and CPII. Las placas para RID se prepararon con 2.0 mL agarosa (Beckton Dickinson) al 1% fundida in PBS, enfriada a 45° C, se le adicionó 150 μ L suero de conejo anti CP de ratón. La mezcla se vació en placas de 35 mm Falcon. La CP de ratón fue usada como estándar (25, 50, 75 y 100 mg/dL) en un volumen de 5 μ L. Los diámetros de los estándares y las muestras se midieron a las 48 hs. Los diámetros de las muestras se interpolaron en la curva de calibración. El análisis intra-ensayo para CP sérica mostró un coeficiente de variación menor al 5%.

Determinación de nitritos. Se cuantificaron usando la reacción de Griess.¹⁰ 100 μ L de la muestra de suero se diluyó 4 veces con agua destilada y se desproteinizó con 20 μ L de sulfato de cinc (300 g/L). Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, Los sobrenadantes se vaciaron en un tubo el cual se preparó previamente con cadmio plateado con

cobre para reducir¹¹ los NO_3^- in NO_2^- . La reacción de reducción se realizó durante 1 h. Los tubos se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 minutos. Se tomaron 200 μ L de las muestras y se colocaron en un tubo con 700 μ L de agua destilada y se les adicionó 50 μ L of sulfanilamida y 50 μ L de N-(1-naftil)-etilendiamina, se adicionó y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos, los tubos se leyeron a 540 nm en un espectrofotómetro Jenway 6305 uv/vis.

Análisis estadístico. Los resultados se analizaron usando el paquete estadístico SPSS para ambientes Windows ver 21 realizando prueba de t de Student y ANOVA, manejando un nivel de significancia¹² al 0.05.

Resultados

No se observaron signos de intoxicación como son: pérdida de peso, salivación, ataxia, convulsiones etc. en los ratones del ensayo de toxicidad aguda, con el extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum*, después de 7 días de observación, no se encontró alteraciones en órganos, determinados por los peso relativo de los órganos (índices de órganos); la determinación de ceruloplasmina y nitritos no mostraron diferencias entre los animales en el modelo de intoxicación y el grupo control (datos no mostrados).

Tabla 1. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones sanos.

Grupos	0 min	60 min	120 min	180 min
Testigo	36.6 \pm 21.37	169 \pm 21.3	206 \pm 24.1	101 \pm 6.55
Tolbutamida	35 \pm 6.27	87 \pm 7.73	118 \pm 22.2	46.6 \pm 5.25a
Glibenclamida	34.6 \pm 1.72	145 \pm 22.4	123.8 \pm 10.7	60.3 \pm 4.08b
Extracto etanólico	32.6 \pm 1.60	136 \pm 24.9	186 \pm 39	102.6 \pm 14.6

Los valores son las medias de los grupos \pm error estándar, n=6 de todos los grupos. aP= 0.002 tolbutamida vs testigo y aP= 0.001 tolbutamida vs extracto etanólico. bP= 0.017 glibenclamida vs testigo y bP= 0.012 glibenclamida vs extracto etanólico.

Tabla 2. Efecto anti-inflamatorio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* en el edema del cojinete plantar de ratón inducido por carragenina durante 5 horas.

Grupo	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
testigo	2.45 \pm 0.05	3.39 \pm 0.10	3.96 \pm 0.09	4.44 \pm 0.182	4.21 \pm 0.27	4.19 \pm 0.03
indometacina	2.32 \pm 0.04	2.45 \pm 0.13*	2.52 \pm 0.04*	3.03 \pm 0.021*	3.22 \pm 0.169*	3.34 \pm 0.04*
Extracto etanólico.	2.40 \pm 0.49	3.29 \pm 0.06	4.0 \pm 0.06	4.23 \pm 0.14	4.19 \pm 0.103	4.03 \pm 0.10

Los valores están en mm y representan las medias \pm los errores estándar, n=6 en cada grupo. *P<0.05 indometacina vs testigo y extracto etanólico.

Tabla 3. Efecto del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* sobre la formación de granuloma.

Grupo	Peso seco del pellet	Porcentaje de Inhibición
testigo	0.0205±0.001	-
Hidrocortisona	0.0136±0.004*	66.34
Extracto etanólico.	0.0277±0.0017	-

Los valores están en gramos y representan las medias ± el error estándar *P=0.003 hidrocortisona vs salina y *P=0.002 hidrocortisona vs extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum*.

Tabla 4. Índices renales, hepáticos y esplénicos después de 7 días de administración del extracto etanólico.

Grupo	Índices hepáticos	Índices renales	Índices esplénicos.
testigo	5.262±0.208	1.3508±0.060	0.557±0.032
hidrocortisona	5.888±0.190	1.339±0.057	0.258±0.022*
Extracto etanólico.	5.774±0.210	1.402±0.036	0.444±0.055

Los valores están en gramos y representan las medias ± los errores estándar. *P=0.001 hidrocortisona vs salina y extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum*.

No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos en relación a la concentración de nitritos y niveles de ceruloplasmina (datos no mostrados).

Discusión

La pócima que actualmente se está vendiendo, es un extracto etanólico,¹³ razón por la cual se utilizó un extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* el cual no tiene efecto tóxico en el modelo de intoxicación aguda. No se observaron signos de daño, como son pérdida de peso, salivación, convulsiones, ataxia, etc. Tampoco los índices de órganos, de los animales tratados con la administración diaria durante 7 días con 100 mg/kg de peso del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum*, mostraron diferencias estadísticas al final del ensayo, comparados con los índices del grupo control. Estos resultados nos sugieren que cuando menos en los órganos estudiados no encontramos signos de daño; no se encontró diferencia estadística significativa entre el grupo control y el grupo de ensayo de intoxicación en los niveles de ceruloplasmina, que es una proteína de fase aguda, los nitritos que son la forma estable del óxido nítrico tampoco mostró diferencias entre el grupo control y el grupo tratado.

En el ensayo hipoglucemiante a los 180 minutos de la curva de tolerancia a la glucosa, se alcanzan los niveles basales del ayuno, sólo con la glibenclamida y con la tolbutamida, no se

observó efecto alguno del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (Tabla 1). El extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum*, no tiene efecto en la disminución del edema inducido por carragenina (Tabla 2).

El extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* tampoco mostró efecto sobre el granuloma inducido con pellet de algodón (Tabla 3). Con base a los resultados obtenidos de los ensayos de actividad anti-inflamatoria tanto en el modelo agudo como en el crónico, podemos decir que el extracto de la planta no tiene ni efecto anti-inflamatorio ni pro-inflamatorio cuando menos a la dosis usada. La administración diaria de la hidrocortisona, usada como control positivo en la inflamación crónica, induce una disminución en el índice esplénico en los ratones que recibieron diariamente 15 mg/kg de peso, esto es debido a que la hidrocortisona induce apoptosis en linfocitos¹⁴ (Tabla 4).

Conclusiones

En el ensayo de intoxicación agudo usando el extracto etanólico de la planta no mostró efecto tóxico a la dosis experimentada, tampoco tiene efecto alguno como anti-inflamatorio e hipoglucemante en los modelos experimentales probados. Consideramos que es necesario legislar en esta materia, debido a que los pacientes con diabetes y artritis usan estos productos como tratamiento alterno para curar sus males y éstos productos no tienen efecto alguno y lo que es peor abandonan los tratamientos ortodoxos, que han pasado por un control estricto en cuanto a su efectividad.

Agradecimientos

A la DGAPA, UNAM por el apoyo otorgado al Proyecto PAPIME PE-203613.

Agradecemos la valiosa ayuda en la clasificación y aportación de la hierba del sapo a la M. en C. Edelmira Linarez Mazari y al Dr. Robert Bye Boettler, del Instituto de Biología de la UNAM.

Referencias

1. Linares ME, Bye AR, Flores B. Plantas medicinales de México, usos y remedios tradicionales. México. Ediciones del Instituto de Biología, UNAM. 1999.
2. Martínez M. Las plantas medicinales de México. México. Editorial Botas, 2004.
3. Watson RR, Preedy RV. Botanical medicine in clinical practice. London. Cromwell Press. 2008.

4. Miranda LGV, Oranday CA, Chavez MA, Villanueva CMA, Lozano GG, Cruz VDE. Actividad hipocolesterolémica de extractos de *Eryngium heterophyllum*. Revista de Salud Pública y Nutrición. Edición especial. 2006; 9.
5. Rivera M. La yerba del sapo aleja el infarto. Investigaciones en Chapingo demuestran que no sólo reduce el colesterol, sino ataca otros males crónicos. La Jornada virtual. Reportaje de internet. 2002. <http://www.jornada.unam.mx/2002/07/10/048n1con.php?origen=index.html>. Acesso 12 Abr 2012.
6. Estrada E. Yerba del sapo. Formulas herbolarias Erik Estrada. 2012. <http://www.erickestrada.com/yerbadelsapo.html>. Acesso 11 Abr 2012.
7. Marroquín-Segura R, Flores PM, Carreón SR, García BMM, Mora GJLA, Aguilar CA, Hernández AVJ. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A Grey (Rutaceae) stem bark on carrageenan induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. *J Ethnopharmacol.* 2009; 124:639-641.
8. Ehrenwald E, Fox PL. Isolation of nonlabile human ceruloplasmin by chromatographic removal of a plasma metalloproteinase. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 309: 392-395.
9. Guevara I, Iwanejko J, Dembi A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Bek IG, Bartu's S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta.* 1998; 274:177-188.
10. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126:131-138.
11. Ferrán AM. SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico. McGraw-Hill/interamericana de España SA.1996.
12. Estrada E. Yerba del sapo Maravilloso producto naturista 2007. <http://www.yerbadelsapo.com/2007/01/yerba-del-sapo.html> Acesso 30 Abr 2012.
13. Iwata, M., Hanaoka, S. and Sato, K. Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur J Immunol.* 21, 643-648.