



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

## **Proyecto de Servicio Social**

### **Proyecto Genérico del Departamento de Sistemas Biológicos:**

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

#### **Etapas:**

Extracción de principios activos o sustancias auxiliares a partir de productos naturales.

## **TÍTULO DEL PROYECTO**

“Aislamiento de los principios activos antiinflamatorios de *Stevia organoides* y evaluación como inhibidores de fosfodiesterasas”

**Nombre del alumno:** Jesús Raúl Pérez Delgadillo

**Matricula:** 2183029425

**Asesor interno:** Dr. Fernando Rodríguez Ramos

**Asesor externo:** Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

# Índice

Introducción .....	3
Marco teórico .....	4
Inflamación.....	4
Tratamientos de la inflamación.....	5
Plantas medicinales.....	6
Plantas del género <i>Stevia</i> .....	6
<i>Stevia organoides</i> .....	7
Técnicas de extracción vegetal.....	7
Cromatografía .....	8
Justificación .....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
Metodología .....	12
Obtención de los extractos orgánicos de <i>S. organoides</i> .....	12
Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos en el modelo de edema auricular de ratón inducido con 12-aceteto de-O-tetradecanoilforbol (TPA).....	12
Separación y evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones del extracto activo..	13
Evaluación de la toxicidad aguda <i>in vivo</i> .....	14
Evaluación de la actividad antiulcerogástrica del extracto activo. ....	15
Resultados .....	15
Obtención de los extractos orgánicos de <i>S. organoides</i> . ....	15
Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos.....	16
Evaluación de la toxicidad aguda <i>in vivo</i> .....	17
Evaluación de la actividad antiulcerogástrica del extracto activo. ....	19
Discusión .....	20
Conclusión .....	20
Perspectivas .....	21
Bibliografía .....	21

## Introducción

La inflamación es una respuesta del sistema inmune para reparar el daño causado por medios físicos, químicos y biológicos. La inflamación puede ser aguda o crónica, según su duración. El tratamiento prolongado con medicamentos antiinflamatorios convencionales como los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) o antiinflamatorios esteroideos (AIEs) conlleva la presencia de efectos secundarios o colaterales, que en algunos casos, puede derivar en reacciones adversas graves como las úlceras gástricas en el caso de los AINES o inmunosupresión en el caso de los AIEs. El uso de plantas medicinales como fitomedicamentos puede resultar una alternativa terapéutica, siempre y cuando se demuestre experimentalmente su seguridad y eficacia.

Por ejemplo, las plantas del género *Stevia* se caracterizan por su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de malestar estomacal, dolor moderado, o inflamación por lo que pudiera ser una alternativa al tratamiento de procesos inflamatorios, no obstante, *Stevia Origanoides* ha sido poco estudiada.

Con base en lo mencionado, el objetivo de este proyecto de servicio social fue determinar la actividad antiinflamatoria de *Stevia origanoides*.

La importancia de realizar este trabajo radica en la búsqueda de productos naturales con actividad farmacológica antiinflamatoria. Así mismo, la presente investigación experimental se podrá utilizar para continuar investigaciones con *S. origanoides*.

## Marco teórico

### Inflamación.

Cuando se presenta un daño en el organismo causado por medios físicos, químicos o biológicos, la inflamación resulta como una respuesta del sistema inmune para reparar el daño, presentando signos como dolor, calor, rubor y edema, además de pérdida de funcionalidad cuando se trata de una inflamación prolongada (Villalba, 2014). La inflamación se clasifica, de acuerdo con su duración, en inflamación aguda y crónica, mientras que el primero es una respuesta benéfica, la inflamación crónica puede provocar daño tisular (Campos-Xolalpa *et al.*, 2017).

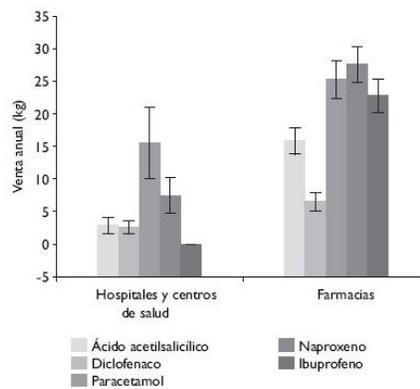
La inflamación se clasifica de acuerdo a su duración, exudado, etiología, morfológicas y localización:

1. Por la duración:
  - a. Aguda: Respuesta inmediata al agente proinflamatorio cuya finalidad es liberar mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión, su comienzo es rápido y dura poco.
  - b. Crónica: Es un proceso prolongado, hay destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación.
2. Por el exudado:
  - a. Trasudado: Presenta líquido extravascular con bajo contenido proteico, producto de un cambio en la permeabilidad vascular.
  - b. Exudado: Presencia de líquido inflamatorio extravascular con alto contenido proteico, lo cual denota permeabilidad en los vasos sanguíneos.
3. Por la etiología:
  - a. Infecciosas: Por bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas.
  - b. Traumática: Golpes intensos con respuesta inmediata o tardía, como ocurre con los esguinces o higromas.
  - c. Térmicas: resultantes de, quemaduras por calor o congelamiento.
  - d. Por exposición a agentes químicos ambientales.

- e. Necrosis tisular.
  - f. Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad a alergenos.
4. Por su morfología:
- a. Serosa: Acumulación de líquido tisular.
  - b. Fibrinosa: Presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno.
  - c. Supurativa o purulenta: Producción de exudados purulentos que consta de leucocitos y células necróticas (Villalba, 2014).

### Tratamientos de la inflamación

El tratamiento con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticosteroides es bastante común, sin embargo, los efectos adversos que causan pueden ser de importancia médica (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012). Se ha demostrado que los AINEs como el ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno y paracetamol tienen efectos genotóxicos, tóxicos y crónicos. En particular, tanto el paracetamol como el naproxeno, los fármacos más vendidos en México, son hepatotóxicos a dosis elevadas, el Ibuprofeno, tercer lugar en venta libre (gráfica 1), es un genotóxico cuando se administran altas dosis (Rodríguez-Anaya *et al.*, 2015).



Grafica 1 Venta anual de AINEs en Hidalgo, México, 2015.  
(Rodríguez-Anaya *et al.*, 2015).

La frecuencia de las reacciones adversas a medicamentos (RAMs) relacionadas con la administración de AINEs son múltiples y variadas, las más comunes son erupciones cutáneas, prurito y edemas, no obstante, las úlceras gástricas también significan una reacción adversa de importancia tras la administración de AINEs (Ríos-Quintana y Estrada-Hernández, 2018).

Los AINEs pueden alterar la mucosa gástrica, tienen efecto sobre la regeneración celular, disminuyen el índice de mitosis y de la síntesis de ADN en las úlceras inducidas por AINEs, con lo que los mecanismos de reparación tisular son defectuosos. Entre un 20 y un 30% de los pacientes que toman AINEs desarrollan síntomas persistentes de la gastropatía por este tipo de medicamento (Sebastián, 2002).

### Plantas medicinales

México es un país con una gran diversidad botánica y los remedios herbolarios de la medicina tradicional mexicana son utilizados para tratar distintas enfermedades o sus sintomatologías. Las plantas medicinales han sido una de las opciones viables empleadas en México para la atención a la salud a lo largo de los años, siendo utilizadas para tratar en su mayoría inflamación, dolor, náuseas, estreñimiento, tos, resfriado, etc. (Urióstegui-Flores y Villaseñor-Franco, 2021).

Se utilizan las diferentes partes de la planta, según sea la afección, lo más común es usar las hojas, las flores, el tallo o la raíz. Las plantas se consumen directamente o pueden prepararse como infusiones o en presentación homeopática. El uso de terapias complementarias, que incluyen los remedios con plantas, es una práctica común y continúa extendiéndose a nivel mundial, no obstante, generalmente se desconocen los principios activos responsables de los efectos terapéuticos que se les atribuyen. (Guzmán *et al.* 2017)

### Plantas del género *Stevia*

Las plantas del género *Stevia* pertenecen a la familia *Asteraceae*, se caracterizan por su uso en la medicina tradicional, diversos autores han reportado propiedades medicinales en las especies de este género. Por ejemplo, el aceite esencial de *Stevia serrata* presenta actividad antiinflamatoria (Pérez *et al.* 2019) y la *Stevia rebaudiana* presenta efecto vasodilatador, diurético, cardiotónico, antitumoral y antiinflamatorio en ensayos *in vivo* en ratas y ratones (Gutiérrez, 2015). Se reportó que los extractos fenólicos de *Stevia origanoides*, *S. ovata* y *S. viscida* presentan propiedades antioxidantes, contienen flavonoides como quercetina y kaempferol (Medina-Medrano *et al.*, 2019).

### Stevia organoides

*Stevia scabridula* o *Stevia organoides* Kunth, es una planta endémica mexicana, se pueden encontrar ejemplares en 27 estados del país, entre ellos Michoacán, Morelos, Guerrero y San Luis Potosí conocida también como burrillo o hierba del burro (Villagómez-Flores *et al*, 2018). *S. organoides* es una planta herbácea perenne, tallo erecto, subleñoso, se caracteriza por presentar un involucro cilíndrico, uniseriado, formado por cinco brácteas que rodean a cinco flores y aquenios cilíndricos a fusiformes; por lo general con un vilano de escamas, escamas y aristas, o coroniforme. *S. organoides* se utiliza generalmente como una infusión de sus partes aéreas para tratar la fiebre (Bello-González *et al*, 2015).

En investigaciones de Cerda-García-Rojas y colaboradores (1993), se reporta que el extracto hexánico de las raíces de *S. organoides* contiene tres derivados de longipineno, cuyas estructuras se establecieron mediante métodos espectroscópicos de infrarrojo y resonancia magnética nuclear. Así mismo se ha reportado el aislamiento e identificación de tres lactonas sesquiterpénicas del tipo heliangolida del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Stevia organoides*, estas lactonas han sido identificados como eucannabinolida, hiodorilactona F y acetato de 19-O-eucannabinolida (Calderón *et al*, 1987).



Figura 1. *Stevia organoides*  
Nota. Adaptado de Plants of the World Online (2023).

### Técnicas de extracción vegetal

Los métodos de separación dependen de las propiedades físicas de los componentes de una planta que permiten la obtención de extractos y/o aceites esenciales.

Los métodos de separación más utilizados son los siguientes:

- Maceración: Se refiere a la trituración de compuestos botánicos, y su posterior inmersión en algún disolvente a temperatura ambiente, ya que algunas plantas no pueden someterse a altas temperaturas debido a su probable pérdida de principios activos (Ruiz, 2020).
- Destilación por arrastre de vapor: método de separación utilizado para la extraer aceites esenciales de alguna planta, en el cual el vapor pasa a través del material vegetal separando los compuestos volátiles que contiene los aceites deseados y los separa mediante condensación (Ruiz, 2020).
- Percolación: El material vegetal triturado es colocado en un percolador en contacto con algún disolvente, se filtra el material vegetal por gravedad a través del percolador y se colecta el extracto en otro contenedor. (Benítez *et al.*, 2020).

### Cromatografía

La cromatografía es un proceso donde los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria. Las cromatografías se pueden clasificar por la forma física de la fase estacionaria (Sgariglia *et al.*, 2010).

- Cromatografía en columna: consta de una columna cromatográfica con la fase estacionaria dentro de ella por la que eluye el disolvente, figura 2

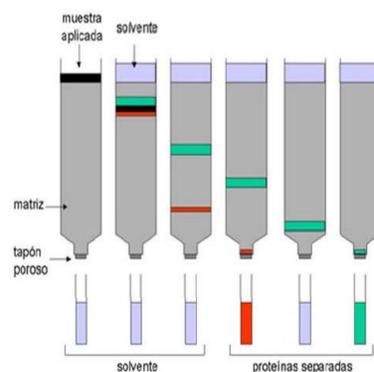


Figura 2 Cromatografía en columna

Nota. Adaptado de Sgariglia *et al.* (2010).

- Cromatografía en capa fina: la fase estacionaria se distribuye como una capa fina y homogénea sobre un soporte plano de material inerte, figura 3.

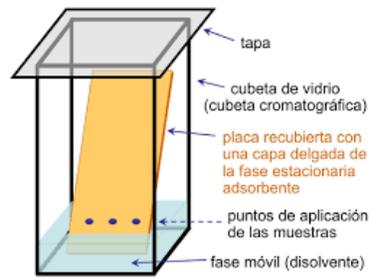


Figura 3 Cromatografía en placa

Nota. Adaptado de Sgariglia et al. (2010).

- Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR): La fase móvil es líquida, su función es llevar la muestra a través de la fase estacionaria, que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte. Los componentes más afines con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan mayor afinidad con la fase móvil, figura 4 (Suarez y Morales, 2018).

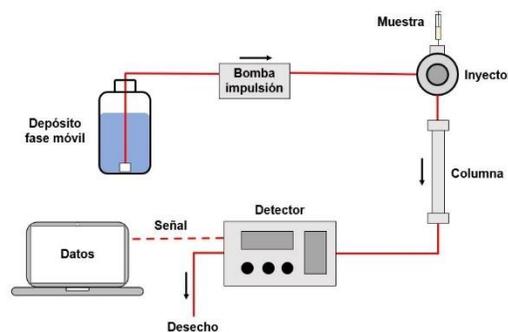


Figura 4. Cromatografía líquida de alta resolución.

Nota. Adaptado de VIRESA. (2022).

- Cromatografía de intercambio iónico: se basa en el equilibrio de los iones de soluto entre el disolvente y los sitios cargados de la fase estacionaria que cuenta con intercambiadores aniónicos los cuales retienen a los aniones del soluto y con intercambiadores catiónicos que retienen a los cationes del soluto, figura 5 (García, 2017).

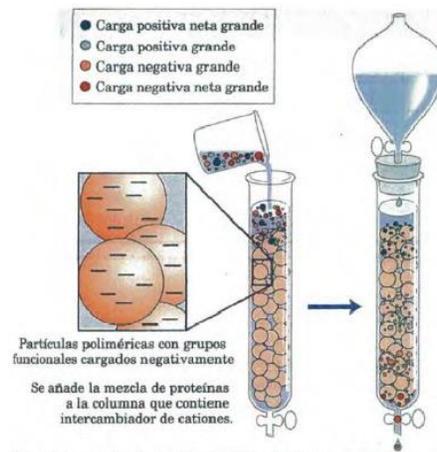


Figura 5. Cromatografía de intercambio iónico.

Nota. Adaptado de Chegg (2023).

- Cromatografía por afinidad: Se utilizan interacciones específicas entre un tipo de moléculas de soluto y otras moléculas que se unen covalentemente a la fase estacionaria, figura 6 (García, 2017).

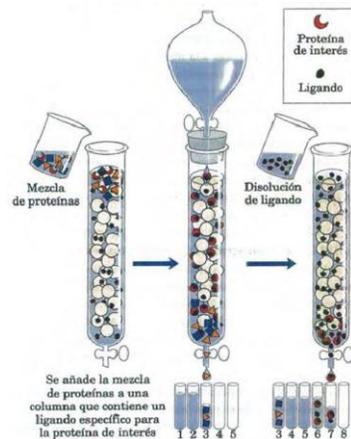


Figura 6 Cromatografía por afinidad.

Nota. Adaptado de Chegg (2023).

- Cromatografía de gases: Un líquido volátil o un soluto gaseoso son arrastrados por una fase móvil gaseosa que circula sobre una fase estacionaria líquida que recubre un soporte sólido, figura 7 (García, 2017).

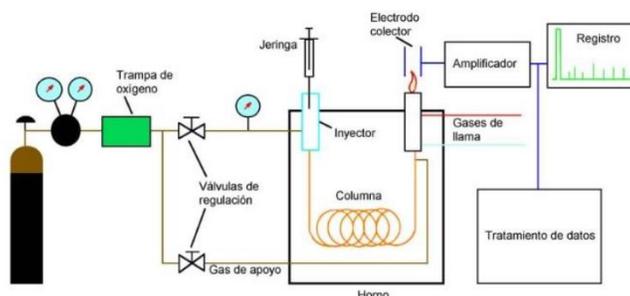


Figura 7 Cromatografía de gases.

Nota. Adaptado de Uniiquim (2016).

## Justificación

La investigación sobre nuevas alternativas de tratamiento seguras y efectivas requiere de la obtención de nuevos compuestos de fuentes naturales que sirvan como base para el desarrollo de nuevos fármacos con efectos terapéuticos antiinflamatorios y que su administración no cause tantos efectos no deseados como algunos medicamentos tradicionales utilizados en la clínica. Es así que este proyecto buscó el aislamiento de los compuestos antiinflamatorios de los extractos orgánicos de *Stevia organoides*.

## Objetivo general

Aislar los principios activos antiinflamatorios de *Stevia organoides* y evaluar su mecanismo de acción vía inhibición de fosfodiesterasas.

## Objetivos específicos

1. Obtener los extractos orgánicos de las partes aéreas de *Stevia organoides* en n-hexano, diclorometano y metanol.
2. Identificar el extracto con mayor actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* de edema auricular de ratón.
3. Fraccionar el extracto con mayor actividad por cromatografía en columna y evaluar las fracciones en el modelo *in vivo* edema auricular de ratón para determinar la fracción en donde se concentra la actividad antiinflamatoria.
4. Repetir el proceso hasta llegar al aislamiento del o los metabolitos secundarios responsables de la actividad antiinflamatoria.
5. Caracterizar los principios activos determinando sus propiedades físicas y espectroscópicas y espectrométricas.

6. Evaluar los metabolitos bioactivos como inhibidores de fosfodiesterasas en un modelo *in vitro*.
7. Comparar el efecto a nivel enzimático con el grado de interacción metabolito – enzima a través de un estudio de acoplamiento molecular “docking”.

## **Metodología**

### Obtención de los extractos orgánicos de *S. origanoides*

Las partes aéreas de *S. origanoides* se recolectaron en la carretera Río verde en el estado de San Luis Potosí, México, en septiembre del 2021, el material vegetal fue identificado por el M. en C. Gabriel Flores Franco y un espécimen se depositó en el Herbario de la Universidad del Estado de Morelos (HUMO39820). El material vegetal se secó a temperatura ambiente, a la sombra, y posteriormente fue molido en una licuadora eléctrica, para obtenerse 250 g de material vegetal triturado. La extracción del material vegetal se realizó por maceración a temperatura ambiente con 2.5 L de *n*-hexano, diclorometano y finalmente con metanol durante 72 h. Después, la mezcla se filtró al vacío, y los extractos, de diclorometano (EDM), hexano (EH) y metanol (EM), se concentraron en un evaporador rotatorio a presión reducida y posteriormente se llevaron a sequedad evaporando el disolvente restante en un baño maría.

### Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos en el modelo de edema auricular de ratón inducido con 12-aceteto de-O-tetradecanoilforbol (TPA).

Para el experimento se utilizaron ratones macho cepa CD1, de un peso entre 20 g y 25 g, obtenidos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.

Se prepararon 4 muestras, diluyendo 20 mg de los tres extractos secos e indometacina, en 200 µL de su respectivo disolvente, la indometacina se disolvió en acetona. Se preparó una solución de TPA en acetona calculando 2.5 µg de TPA disueltos en 20 µL de acetona por ratón, se indujo la inflamación administrando 10 µL en cada lado de la oreja derecha de los ratones de los cuatro grupos (8 ratones por grupo) con una micropipeta, después de 30 minutos, se administraron 2 mg de extracto por oreja, aplicando 10 µL de los tratamientos vía tópica en ambos lados de la misma oreja, 4 h después de la administración, se sacrificó

a los animales por dislocación cervical, se procedió a horadar ambas orejas de cada ratón, la oreja derecha, a la que se le indujo la inflamación y la oreja izquierda que se utilizó como referencia. Se repitió el experimento, para evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto hexánico. Finalmente se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos calculando la desviación y el error estándar de la diferencia de pesos entre las orejas de cada ratón. (Campos-Xolalpa *et al.* 2021). La fórmula utilizada para obtener el porcentaje de inhibición de la inflamación es la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(N - T)}{N} * 100$$

Donde:

N = Promedio de las diferencias del peso de cada par de orejas (izquierda y derecha) del grupo control negativo.

T = Promedio de las diferencias del peso de cada par de orejas del grupo administrado con tratamiento o muestra de extracto.

#### Separación y evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones del extracto activo.

Una vez identificado el extracto activo, se fraccionaron 100 mg de EDM por cromatografía en columna, empacada con sílica gel, utilizando como eluyente hexano, al cual se le aumentó la polaridad con acetato de etilo y metanol consecutivamente, se obtuvieron 14 fracciones, colectadas en volúmenes de 150 mL cada una, mismas que fueron concentradas en un evaporador rotatorio a presión reducida. Posteriormente se realizó una cromatografía en placa a las 14 fracciones y aquellas que presentaron el mismo patrón de elución se juntaron.

Posteriormente, se evaluó la actividad antiinflamatoria de las 3 fracciones, fracción B (FB), fracción C (FC) y fracción D (FD) en un modelo de edema auricular de ratón inducido por aceite de crotón, disolviendo 10  $\mu$ L del aceite en 3.7 mL de acetona y aplicando 10  $\mu$ L en ambas caras de la oreja derecha de cada ratón de los 4 grupos (8 ratones por grupo) para inducir inflamación, así mismo, se prepararon muestras de las fracciones a evaluar disolviendo 20 mg de cada fracción seca en 200  $\mu$ L de diclorometano, 30 minutos después de administrar el aceite de crotón, se administró una dosis de 2 mg por oreja vía tópica, 4

h después de la administración, se sacrificó a los animales por dislocación cervical para encontrar la fracción de EDM con la mayor actividad antiinflamatoria mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos a partir de la diferencia de pesos del horadado auricular de ambas orejas de los ratones.

La fracción FD del extracto de diclorometano presentó un precipitado sólido, este se filtró al vacío y se secó en una estufa de vacío durante 24 h para posteriormente evaluar su actividad antiinflamatoria en el modelo *in vivo* de edema auricular de ratón inducido por aceite de crotón, disolviendo 10  $\mu$ L del aceite en 3.7 mL de acetona, se aplicó a cada ratón 2 mg de fracción por oreja. Posteriormente se preparó una muestra del sólido de FD disolviendo 20 mg del sólido en 200  $\mu$ L de diclorometano para posteriormente administrar 10  $\mu$ L de la muestra a cada ratón en la misma oreja. Posteriormente, se calculó su porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida mediante el análisis estadístico de la diferencia de pesos del horadado auricular de los ratones.

#### Evaluación de la toxicidad aguda *in vivo*

Se utilizaron 25 ratones macho CD1 divididos en grupos de 5 ratones cada uno, se prepararon distintas muestras de EDM para administrar a 4 grupos de ratones a dosis de 5000 mg/kg, 2500 mg/kg, 1250 mg/kg y 625 mg/kg respectivamente. El grupo restante se utilizó como control. Cada muestra se preparó con EDM-PVP a una proporción 1:3, tabla 1.

Tabla 1. Cantidades para la preparación de muestras en toxicidad aguda.		
Dosis de la muestra (mg/kg)	Cantidad de EDM (mg)	Cantidad de PVP (mg)
5000	750	2250
2500	375	1125
1250	187.5	562.5
625	93.8	281.4
313	47	141

Las muestras se prepararon disolviendo EDM y PVP en 3 mL de diclorometano, una vez preparada la mezcla, se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida y posteriormente se dejó en la estufa de vacío por 24 h, transcurrido este periodo, se agregó a cada muestra solución salina como vehículo (0.6 mL) y se disolvió completamente.

Posteriormente, se administró a cada ratón 100  $\mu$ L de la muestra correspondiente vía oro-gástrica mediante una cánula metálica. Una vez finalizada la administración, se observó el comportamiento de los animales una hora al día durante 72 h, determinando si se presentaba alguna anomalía en el comportamiento de estos, como mareo, dolor, inmovilidad, contracción estomacal, diarrea o muerte.

#### Evaluación de la actividad antiulcerogástrica del extracto activo.

Se utilizaron 5 lotes de 8 ratones macho cepa CD1, de un peso entre 20 g a 25 g, obtenidos de la UPEAL en la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. 24 horas antes del experimento, se les retiró el alimento a los ratones. Un lote se administró con EDM a dosis de 100 mg/kg, otro lote con 200 mg/kg. Al tercer lote, control positivo, se le administraron 40 mg/kg de pantoprazol, al cuarto lote únicamente se administró con etanol y los ratones del lote 5 no fueron administrados. Después de 40 minutos, administraron a 4 grupos 100  $\mu$ L de etanol, las administraciones fueron vía oro-gástrica y 40 minutos después se sacrificaron a los ratones por dislocación cervical, y analizar el tejido de sus estómagos para observar el posible daño causado por el etanol administrado, cuantificando el daño visible en forma de úlceras gástricas de diferentes tamaños o enrojecimiento del tejido.

## Resultados

#### Obtención de los extractos orgánicos de *S. origanoides*.

Se obtuvieron tres extractos orgánicos de *S. origanoides*, se pesaron en una balanza analítica y se calculó el rendimiento de cada extracto a partir de la cantidad inicial de material vegetal macerado, tabla 2.

<i>Tabla 2. Cantidad y rendimiento de los extractos</i>			
	Hexano	Diclorometano	Metanol
Peso del extracto seco	3.3 g	9.15 g	5.25 g
Rendimiento del extracto	1.32 %	3.66 %	2.1%

El extracto de diclorometano resultó tener un rendimiento mayor que los otros dos extractos, es decir, se obtiene una mayor cantidad de extracto orgánico de *S. origanoides* con diclorometano que con hexano o metanol.

#### Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos.

La actividad antiinflamatoria de los extractos hexánico, de diclorometano y metanólico se determinó en el modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA. Los resultados obtenidos (tabla 3) muestran que el extracto hexánico no tiene actividad en este modelo y que el efecto antiinflamatorio de los otros dos extractos es similar a la de la indometacina, Por consiguiente, se eligió el extracto de diclorometano para separar sus componentes por cromatografía en columna.

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de tres extractos de *S. origanoides* en el modelo de edema auricular en ratón inducido con TPA.

<i>Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la inflamación</i>				
	Indometacina	Hexano	Diclorometano	Metanol
Porcentaje de inhibición	53.2% ± 6.8	14.18% ± 3.5*	54.99% ± 5.5	54.72% ± 4.8

Media ± EE de dos experimentos independientes. n= 8. Diferencia significativa comparado con el grupo control (\*)  $p < 0.05$ .  $p = 0.972$ .

Una vez realizada la cromatografía en placa de las 14 fracciones obtenidas de EDM, se identificaron las fracciones que mostraran similitud en su composición y se juntaron. Resultaron 4 fracciones diferentes entre sí (FA, FB, FC y FD) descritas en la Tabla 4.

<i>Tabla 4. Mezcla de fracciones</i>		
Grupo de fracciones	Fracciones de EDM que la componen	Concentración de fracción
FA	1, 2, 3 y 4	80% hexano – 20% acetato de etilo
FB	5, 6 y 7	60% hexano – 40% acetato de etilo
FC	8, 9, 10 y 11	95% acetato de etilo – 5% metanol

FD	12, 13 y 14	50% acetato de etilo - 50% metanol
----	-------------	------------------------------------

De las fracciones juntadas, se descartó utilizar la fracción FA, al ser una fracción poco polar, con apariencia cerosa, por lo que deben ser ácidos grasos. Los resultados obtenidos con las fracciones FB, FC y FD en el modelo de edema auricular inducido con aceite de croton se muestran en la Tabla 5.

<i>Tabla 5. Porcentaje de inhibición de la inflamación de las fracciones activas</i>				
	Indometacina	FB	FC	FD
Porcentaje de inhibición experimento 1	89.43% ± 1.1	88.53% ± 2.5	93.70% ± 2.35	-
Porcentaje de inhibición experimento 2	97.46% ± 0.27	-	-	97.34 ± 0.3

Media ± EE de dos experimentos independientes. n= 8. No se encontraron diferencias significativas comparado con el grupo control p =0.206.

En la tabla 5 se muestra que las fracciones FB, FC y FD mostraron actividad antiinflamatoria comparadas con indometacina en ambos experimentos. De acuerdo con el análisis de varianza, no hay diferencias significativas entre la actividad antiinflamatoria de las fracciones y de indometacina.

El sólido hallado en la fracción FD mostró un porcentaje de inhibición de la inflamación del 61.42 % ± 6.2 comparado con un 71.42 % ± 5.2 de inhibición de la indometacina. Posteriormente, se realizaron múltiples cromatografías en columna a EDM con el fin de obtener una mayor cantidad del sólido de FD, sin embargo, la purificación del sólido activo no se llevó a cabo.

#### Evaluación de la toxicidad aguda *in vivo*

Se evaluó la toxicidad aguda de EDM en ratones. Durante 72 h después de la administración no se observó cambio en el comportamiento de los animales. una vez transcurrido este periodo se sacrificaron los animales para observar el daño en los órganos

internos, bazo, hígado, riñones, intestinos y estómago. Los cambios observados en estos órganos se muestran a continuación en la tabla 6.

<i>Tabla 6. Toxicidad aguda in vivo</i>					
Dosis (mg/kg)	5000	2500	1250	625	Control
Ratones muertos	0	0	0	0	0
Órganos	Presencia de daño				
Bazo	SD	SD	SD	SD	SD
Hígado	D 5 de 5	D 4 de 5	D 4 de 5	D 2 de 5	SD
Riñones	SD	D 1 de 5	SD	SD	SD
Intestinos	D 3 de 5	D 2 de 5	D 1 de 5	D 3 de 5	SD
Estómago	SD	SD	SD	SD	SD

\* **SD**: sin daño comparado con el grupo control. **D**: daño observado en comparación con el grupo control.

Debido a que todos los grupos presentaron daño, se repitió el experimento, pero en esta ocasión se probó una dosis más baja, Tabla 7.

<i>Tabla 7. Toxicidad aguda in vivo</i>					
Dosis (mg/kg)	2500	1250	625	313	Control
Ratones muertos	0	0	0	0	0
Órganos	Presencia de daño				
Bazo	SD	SD	SD	SD	SD
Hígado	D 4 de 5	D 3 de 5	D 2 de 5	SD	SD
Riñones	SD	SD	SD	SD	SD
Intestinos	D 2 de 5	D 1 de 5	D 1 de 5	SD	SD
Estómago	SD	SD	SD	SD	SD

\* **SD**: sin daño comparado con el grupo control. **D**: daño observado en comparación con el grupo control.

La mayoría de las dosis probadas en estos experimentos resultaron tóxicas, generando daños principalmente en el hígado e intestino, con excepción de la dosis más baja, 313 mg/kg, grupo en el que no se encontró daño de tejido en ninguno de los órganos analizados. Por lo tanto, se puede inferir que a dosis menores de 313 mg/kg, EDM no es tóxico.

#### Evaluación de la actividad antiulcerogástrica del extracto activo.

Se estimó un porcentaje de tejido dañado de cada grupo administrado, Figura 8, tomando en cuenta la coloración del tejido, el número y tamaño de heridas o úlceras presentes en los estómagos analizados visualmente, clasificándolas como úlcera pequeña, úlcera mediana o úlcera grande, se asignó un porcentaje de daño mayor a los estómagos con mayor número y tamaño de úlceras, así como una coloración diferente a la referencia del grupo control, sin daño.

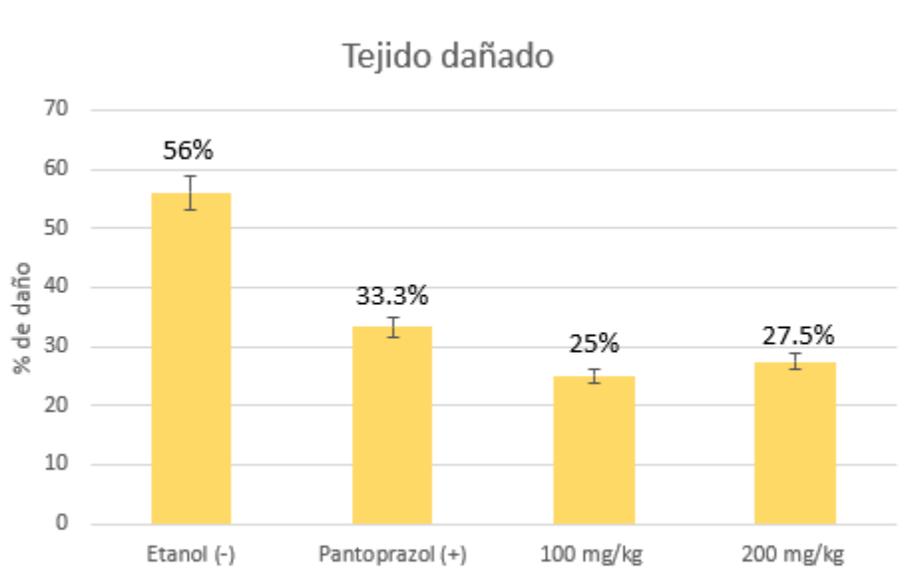


Figura 8. Porcentaje de tejido dañado en los diferentes grupos.

El porcentaje de tejido dañado fue similar en los tres grupos, 33.3% de tejido dañado en el grupo control positivo (pantoprazol), 25% de tejido dañado al grupo de EDM dosis de 100 mg/kg y 27.5% de tejido dañado al grupo de EDM dosis de 200 mg/kg. Los valores obtenidos no presentan diferencias significativas de acuerdo con un análisis de varianza, sin embargo, todas presentan menor porcentaje de tejido dañado en comparación con el grupo control negativo.

## Discusión

La aplicación de TPA en el tejido de la oreja del ratón desencadena una cascada de señalización que activa la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) p38, p44/42, inhibidores de quinasas  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) y fosfatidilinositol 3-quinasa/Akt (PI3K/Akt), que, a su vez, fosforilan I $\kappa$ B $\alpha$  y p65, contribuyendo a la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y la posterior inducción de óxido nítrico sintasa (NOS) y ciclooxigenasa-2 COX-2. lo que provoca inflamación (Ching-Shu *et al.*, 2007). Sin embargo, al ser inhibidos por un agente antiinflamatorios como la indometacina, y los extractos orgánicos evaluados, se promoverá la inhibición de la inflamación. De acuerdo con los resultados sobre la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA, los extractos de *S. origanoides*, posiblemente estén inhibiendo la activación de las MAPK lo que evita la inducción de NOS y COX-2 disminuyendo la inflamación en las orejas de los animales.

El etanol activa la transcripción de muchos mediadores proinflamatorios, incluidos la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), lo que propicia el daño tisular y la formación de úlceras gástricas (Hiraganahalli y Evan, 2021). Lo anterior puede dar explicación al daño e irritación observados en el tejido estomacal de los animales administrados con etanol. En contraste, el pantoprazol inhibe la secreción ácida gástrica basal, de forma dosis-dependiente, mediante la inhibición de la bomba (H $^{+}$ , K $^{+}$ ) ATPasa dependiente, forma enlaces covalentes en la membrana de las células secretoras de ácido gástrico (Palacios-Lara, J. *et al.*, 2018). Esta inhibición de la bomba de protones podría ocurrir de igual manera con los extractos orgánicos de *S. Origanoides* y así evitar que se promueva daño tisular en los ratones administrados con etanol al inhibir la secreción de ácido clorhídrico.

Es de importancia tomar en cuenta que los extractos evaluados representan una mezcla de compuestos, por lo que su actividad antiinflamatoria y antiulcerogástrica se podría deber al posible sinergismo entre estos compuestos o al compuesto mayoritario de cada extracto.

## Conclusión

Los extractos de diclorometano y metano de *Stevia organoides* tienen actividad antiinflamatoria, a dosis menores de 313 mg/kg no es tóxico. El extracto de diclorometano presenta actividad antiulcerogástrica a una dosis de 100 mg/kg.

## Perspectivas

La investigación biodirigida realizada fue de importancia, ya que las propiedades antiinflamatorias de los extractos orgánicos de *S. organoides* no habían sido investigadas. Sin embargo, debido a que no se aisló el o los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria, no se pudo evaluar la actividad sobre fosfodiesterasas, se recomienda a futuros investigadores continuar evaluando los extractos orgánicos de *S. organoides*, experimentar con el extracto metanólico y sus fracciones, evaluar la actividad antiulcerogástrica del extracto de diclorometano a dosis menores de 100 mg/ kg, purificar el sólido presente en FD, continuar los estudios biodirigidos para caracterizar los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria determinando sus propiedades físicas y espectroscópicas y espectrométricas, además, evaluar los metabolitos bioactivos como inhibidores de fosfodiesterasas con el fin de comparar el efecto a nivel enzimático con el grado de interacción metabolito – enzimas.

## Bibliografía

1. Bello-González, M., Hernández-Muñoz, S., Lara-Chávez, M. y Salgado-Garciglia, R. (2015). Plantas útiles de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Polibotánica*. (39). 175-215.
2. Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R., Gallo-Corredor, J., Pérez-Pacheco, N., Álvarez Sandoval, J. y Giraldo-Aristizabal, C. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*. 15(1). 31–40.
3. Campos-Xolalpa, N., Alonso-Castro, N., Sánchez-Mendoza, E., Zavala-Sánchez, M. y Pérez-Gutiérrez, S. (2017). Cytotoxic activity of the chloroform extract and four diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 27(3). 302–305.
4. Calderón, J., Quijano, L., Gómez, F. y Ríos, T. (1987). Heliangolides from *Stevia organoides*. *Journal of Natural Products*. 50(3). 522-522.
5. Cerda-García-Rojas, C., Sánchez-Arreola, E., Joseph-Nathan, P., Román, L. y Hernandez, J. (1993). Longipinene derivatives from *Stevia organoides*. *Phytochemistry*. 32(5). 1219-1223.

6. Chegg (2023). *Técnicas de separación de proteínas*. <https://www.chegg.com/flashcards/tecnicas-de-separacion-de-proteinas-86b4aafa-7672-4521-bef2-bbc2875a1185/deck>
7. Ching-Shu L., Shiming, L., Chee-Yin, C., Chih-Yu, L., Chi-Tang, H., Ying-Jan, W. y Min-Hsiung, P. (2007). Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice. *Carcinogenesis*. 28(12). 2581–2588.
8. Gutiérrez, A. (2015). *Bioquímica, farmacología y toxicología de Stevia rebaudiana Bertoni. Universidad Complutense*.
9. García, M. (2017). *Cromatografía de gases y líquidos. Universidad Autónoma del Estado de México*. [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/70804/secme-1814\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/70804/secme-1814_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
10. Guzmán, H. Díaz, R. y González, M. (2017). Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Y Pecuarias*. 7-9.
11. Hiraganahalli, D., y Evan, S. (2021). Effect of Baricitinib on TPA-induced psoriasis like skin inflammation. *Life Sciences*. 279. 119655.
12. Medina-Medrano, J., Torres-Contreras, J., Valiente-Banuet, J., Mares-Quiñones, M., Vázquez-Sánchez, M. y Álvarez-Bernal, D. (2019). Effect of the solid-liquid extraction solvent on the phenolic content and antioxidant activity of three species of Stevia leaves, *Separation Science and Technology*. 54(14). 2283-2293.
13. Palacios-Lara, J., Jaimes-García, J., Ocaña-Servín, H., Gallardo-Díaz, R., y García-Rillo, A. (2018). Inhibidores de la Bomba de protones. Aspectos farmacológicos basados en la fisiología digestiva. *Medicina e Investigación Universidad Autónoma Del Estado De México*. 6(2). 56-62.
14. Pérez, J., Muñoz, M. y Mérida, M. (2019). Aislamiento y purificación de camazuleno y sus precursores sesquiterpenlactónicos en *Stevia serrata Cav.* de diferentes poblaciones del occidente de Guatemala, como fuente potencial para la obtención de antiinflamatorios naturales. *Universidad de San Carlos de Guatemala*.
15. Pérez-Gutiérrez, S., Sánchez-Mendoza, E., Martínez-González, D., Zavala-Sánchez, M. y Pérez-González, C. (2012). Kramecyne — A New Anti-inflammatory Compound Isolated from *Krameria cytisoides*. *Molecules*. 17(2). 2049–2057.
16. Plants of the World Online. (2023). *Stevia organoides*. *Royal Botanic Gardens*. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:251483-1>.
17. Ríos-Quintana, R. y Estrada-Hernández, L. (2018). Descripción y cuantificación de riesgos atribuidos a analgésicos antiinflamatorios no esteroideos no selectivos consumidos por la población mexicana. *Med. Int. Méx.* (2). 173-187.
18. Rodríguez-Anaya, A., Octavio-Aguilar, P., y Gaytán-Oyarzún, J. (2015). Consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en Pachuca, Hidalgo. *Salud Pública de México*. 57(5). 365-366.

19. Ruíz, M. (2020). Métodos Físicos de Separación Obtención de Extractos e Hidrodestilación. *Universidad Simón Bolívar*.  
<https://hdl.handle.net/20.500.12442/7991>.
20. Sgariglia, M., Soberón, J., Sampietro, D., y Vattuone, M. (2010). Cromatografía: Conceptos Y Aplicaciones. *Revista Arakuku*. (1). 1-6.
21. Sebastián, J. (2002). Gatropatía por AINE. Efectos adversos. *Farmacia Profesional*. 16(7). 48-53.
22. Suarez, D. y Morales, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Revista Semilleros*. 4(1). 7-14.
23. Urióstegui-Flores, A. y Villaseñor-Franco, A. (2021). Plantas medicinales empleadas en comunidades del Estado de Guerrero (México). *Revista de Salud Pública*. 23(4). 204.
24. Villalba, E. (2014). Inflamación I. *Revista de actualización clínica*. (43). 2261-2264.
25. Villagómez-Flores, E., Hinojosa-Espinosa, O., y Villaseñor, J. (2018). El género *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México. *Acta botánica mexicana*. (125). 1315.
26. VIRESA. (2022). ¿Qué es el HPLC y para qué funciona?  
[https://viresa.com.mx/blog\\_que\\_es\\_hplc](https://viresa.com.mx/blog_que_es_hplc)
27. Unidad de informática del Instituto de Química. (2016). *Cromatografía de gases*.  
<https://uniquim.iquimica.unam.mx/glossary/cromatografia-de-gases/>



Vo. Bo.

Dr. Fernando Rodríguez Ramos  
Nombre y firma de asesor interno  
Cargo: Asociado Nivel D  
No. Económico: 35133



Vo. Bo.

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez  
Nombre y firma de asesor interno  
Cargo: Titular C  
No. Económico: 2212