

Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado)

Anti-inflammatory and antimicrobial effect of the alcoholic extract and chemical composition of the oil from *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (deer shinbone) leaves

Patricia Manzano Santana,^I Migdalia Miranda,^{II} Yamilet Gutiérrez,^{III} Gastón García,^{III} Tulio Orellana,^{IV} Andrea Orellana-Manzano^V

^I Máster en Ciencias. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL). Guayaquil, Ecuador.

^{II} Doctora en Ciencias. Departamento de Farmacia. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{III} Máster en Ciencias. Departamento de Farmacia. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{IV} Químico-Farmacéutico. Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la ESPOL (CIBE). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Guayaquil, Ecuador.

^V Licenciada en Química. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Chile. Santiago de Chile, Chile.

RESUMEN

Introducción: la especie *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist, comúnmente llamada canilla de venado, es de origen americano.

Objetivos: contribuir al estudio farmacológico y toxicológico de los extractos alcohólicos y a la evaluación química del aceite de hojas de *C. bonariensis* de Ecuador.

Métodos: se emplearon 2 tinturas a 50 % con etanol a 70 y 90 % de hojas secas. Se realizó un estudio fitoquímico a través del sistema acoplado de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas, se determinó el efecto antimicótico mediante inhibición de dilución en placa con siembra en superficie por diseminación, y antiinflamatorio en el modelo de edema de la oreja inducido por aceite de *Croton* en ratones albinos de la línea OF1.

Resultados: el tamizaje fitoquímico mostró presencia de aceites esenciales, triterpenos-esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antocianidinas, saponinas y compuestos reductores. Se determinó estructuras a 32 componentes

del aceite esencial extraído de las hojas y el sesquiterpeno: trans- β -farneseno resultó el componente mayoritario con 70,82 %, este compuesto se informa por primera vez en esta especie. El extracto hidroalcohólico (25 μ L a cada lado de las orejas tratadas) inhibió significativamente la inflamación comparado con bencidamina.

Conclusiones: los extractos hidroalcohólicos mostraron efecto antiinflamatorio en las condiciones experimentales del estudio y se determinó la composición química del aceite de hojas de *C. bonariensis*.

Palabras clave: *Conyza bonariensis*, trans- β -farneseno, sesquiterpenos, antiinflamatorio.

ABSTRACT

Introduction: the *Conyza bonariensis* (L). Cronquist species, usually called deer shinbone is of American origin.

Objectives: to contribute to the pharmacological and toxicological study of alcoholic extracts and to the chemical assessment of *C. bonariensis* leaf oil from Ecuador.

Methods: two 50 % tinctures of 70 % and 90 % ethanol content in dry leaves were used. A phytochemical study was conducted by an combined system of mass spectrometry and gas chromatography; the amniotic effect was determined using plate dilution inhibition with surface culturing by dissemination, and the anti-inflammatory effect in the Croton oil induced ear edema model in OF1 line albino mice.

Results: the phytochemical screening showed the presence of essential oils, triterpene-steroids, phenolic compounds, flavonoids, quinones, anthocyanidines, saponins and reducing compounds. The structures of 32 essential oil components extracted from the leaves were identified along with and the sesquiterpene trans- β -farnesene that was the major component (70.82 %), this compound is reported for the first time in this species. The hydroalcoholic extract (25 μ L on each side of the treated ears) significantly inhibited inflammation compared to benzidamine.

Conclusions: hydroalcoholic extracts showed anti-inflammatory effect in the experimental conditions of the study and the chemical composition of *C. bonariensis* leaf oil was identified.

Key words: *Conyza bonariensis*, trans- β -farnesene, sesquiterpenes, anti-inflammatory.

INTRODUCCIÓN

La planta *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado), de origen americano,¹ rece silvestre dentro de la extensa flora ecuatoriana y es considerada como una maleza resistente a los herbicidas.² Los zumos de las hojas de esta especie se utilizan desde tiempos ancestrales para curar diversas enfermedades de la piel, en especial la *Pitiriasis versicolor*, comúnmente conocida como "pañó blanco". Esta afección es una micosis superficial crónica, caracterizada por máculas levemente descamativas, de color variable: café, rosadas o blancas, producida por

diferentes especies de hongos del género *Malassezia*,^{3,4} las cuales pueden además, causar o estar asociadas a otros desórdenes dermatológicos, tanto en humanos como animales, y son prevalentes en áreas geográficas tropicales o subtropicales.⁵

C. bonariensis pertenece a la familia Asteraceae, que producen gran variedad de metabolitos secundarios como acetilenos, terpenos, alcaloides y compuestos aromáticos.⁶⁻⁹ Es considerada una planta medicinal, con actividad antioxidante,¹⁰ antibacteriana,^{11,12} antimicótica¹³ y antiinflamatoria.^{12,14}

En el presente trabajo sus autores se propusieron contribuir al estudio farmacológico y toxicológico de los extractos alcohólicos y la evaluación química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado) de Ecuador.

MÉTODOS

Se trabajó con hojas adultas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado), recolectadas al mediodía, en la granja agrícola del bosque protector de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Guayaquil, provincia del Guayas y del Cantón Pueblo Viejo, provincia de los Ríos, en los meses de febrero, agosto y noviembre de los años 2004, 2005 y 2007. El estado vegetativo de la planta fue de floración, y se herborizó con el número CIBE002 en el Herbario Nacional del Ecuador, Quito.

El proceso de secado fue automático a temperatura de 45 °C durante 8 h. Posteriormente se pulverizaron en un molino de cuchillas y se tamizó, se recolectó la fracción que permaneció en el tamiz de 2 mm de diámetro.

A partir de la droga seca se elaboraron 2 tinturas a 50 % con etanol 70 y 90 %; el método empleado para la extracción fue maceración en recipiente cerrado, en ausencia de luz y el tiempo de extracción fue de 14 d, según normas NRSP-312.¹⁵

El estudio farmacológico de *C. bonariensis*, se realizó *in vitro* frente a cepas del género *Malassezia furfur*, se emplearon extractos acuosos 0,1 % y 2 tinturas a 50 % obtenidas con etanol 70 y 90 %. Estos extractos se utilizaron para las pruebas de inhibición siguiendo la técnica de dilución en placa con siembra en superficie por diseminación. A partir de un cultivo de *Malassezia furfur* durante 5 d en incubadora a 32 °C, se preparó una suspensión en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración equivalente a 3×10^8 UFC/mL¹⁶ (1 en el estándar de turbidez de Mc Farland).

Se utilizaron placas Petri con medio de agar Dixon adicionado con distintas diluciones de los extractos, para obtener diferentes concentraciones de estos y se ensayaron concentraciones a 20 % del extracto en orden decreciente. Las placas fueron inoculadas por diseminación en superficie con la suspensión descrita antes.

Paralelamente, se realizaron ensayos sin el agregado del extracto, como control positivo de la técnica con igual volumen del extracto, pero solo del disolvente de la extracción (alcohol etílico 70 y 90 %) para descartar algún posible efecto del solvente. Todas las placas se incubaron a 37 °C hasta 5 d.¹⁶

El estudio antiinflamatorio agudo de *C. bonariensis* se desarrolló mediante el ensayo que induce a la inflamación por aceite de *Croton* en la oreja de ratón.¹⁷ Se

utilizaron ratones albinos de la línea OF1, machos, procedentes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio), los cuales se mantuvieron en cuarentena, cumpliendo con los requisitos de calidad que exigen estos estudios. La tintura fue suministrada por vía tópica, según diseño experimental descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental de la actividad antiinflamatoria aguda

Grupo	Tratamiento
1. Control	Se administró aceite de <i>Croton</i> 10 µL por ambas caras de la oreja y no se suministró medicamento alguno
2. Control positivo (bencidamina)	Se administró aceite de <i>Croton</i> (10 µL) por ambas caras de la oreja e inmediatamente se aplicó crema de bencidamina, de forma que cubriera el pabellón auditivo
3. Tintura de <i>Conysa bonariensis</i>	Se administró aceite de <i>Croton</i> 10 µL por ambas caras de la oreja e inmediatamente se aplicaron (25 µL), de tintura por cada cara del pabellón auditivo de la misma forma que el aceite de <i>Croton</i>

Para el estudio de la irritabilidad se desarrolló la metodología descrita en el PNT/TEC/0207 establecido en el CEIEB-IFAL (Centro de Estudio para la Investigación y evaluaciones biológicas-Instituto de Farmacia y Alimentos). Las lecturas fueron realizadas a 1, 24, 48 y 72 h. Los datos se recogieron en un modelo.

Los estudios químicos se realizaron en el aceite extraído de las hojas de *C. bonariensis*; se empleó para su extracción el método de hidrodestilación cohobación en la planta seca.¹⁸ El tiempo de extracción fue de 3 a 5 h y se realizaron 5 réplicas.

El aceite fue analizado por el sistema acoplado cromatografía gaseosa-espectrometría de masas en un equipo *Agilent* serie 6890N, equipado con un detector selectivo de masas, serie 5973N. La inyección de la muestra se realizó por el modo *split* con una relación de 1:10, con la temperatura del inyector a 280 °C.

Los estudios estadísticos se realizaron mediante el cálculo de la media y la desviación estándar para cada grupo de los pesos de los discos de oreja obtenidos y a continuación se aplicó un análisis de varianza de una vía de clasificación y *a posteriori* la prueba de Student Newman Keuls ($p < 0,05$).

RESULTADOS

El extracto alcohólico 90 % manifestó una notable actividad sobre *M. fufur* a bajas concentraciones. El ensayo en orden decreciente evidenció una falta de desarrollo hasta una concentración de 2,1 % del extracto, la última concentración en que se obtuvo desarrollo resultó de 2 %.

En la tabla 2 se presentan los resultados del ensayo del efecto antiinflamatorio de tintura de *C. bonariensis*.

Los porcentajes de inflamación y de inhibición de tintura de *C. bonariensis* se presentan en la tabla 3.

Tabla 2. Ensayo del efecto antiinflamatorio de la tintura de *Conyza bonariensis*

Grupo	Peso medio de las orejas (mg)	
	Derecha	Izquierda
	($\bar{x} \pm DE$)	($\bar{x} \pm DE$)
I. Control (aceite de <i>Croton</i>)	19,1 \pm 1,49 a	9,91 \pm 1,01 c
II. Control (bencidamina)	10,40 \pm 0,39 b	9,42 \pm 0,68 c
III. Tintura de <i>Conyza bonariensis</i>	11,86 \pm 0,23 c	9,15 \pm 0,28 c

Grupos con al menos una letra en común no tienen diferencias significativas estadísticamente (para el caso de una misma columna).

Tabla 3. Porcentajes de inflamación e inhibición de la tintura de *Conyza bonariensis*

Grupo	% de inflamación	% de inhibición
I. Control (aceite de <i>Croton</i>)	92,7	-
II. Control (bencidamida)	10,4	90,95
III. Tintura de <i>Conyza bonariensis</i>	29,6	68,06

Los resultados obtenidos en el estudio de la irritabilidad dérmica de la tintura de *C. bonariensis* después de haber sido administrado el producto, demostraron que se produjeron lesiones eritematosas y edematosas ligeras, las cuales fueron desapareciendo a las 48 h en los sitios de aplicación, por lo que se obtuvo un índice de irritación primario igual a 0,12; esto evidencia que la tintura en estudio puede ser clasificada como no irritante. Desde el punto de vista clínico no se produjeron alteraciones en los animales objeto de estudio.

Estudio químico del aceite esencial de C. bonariensis

Los resultados del cromatograma gaseoso analítico del aceite esencial de *C. bonariensis* se presentan en la figura 1.

En el cromatograma se observan más de 60 picos, algunos de ellos de abundancia relativa y se identificaron 32 componentes que se describen en la tabla 4.

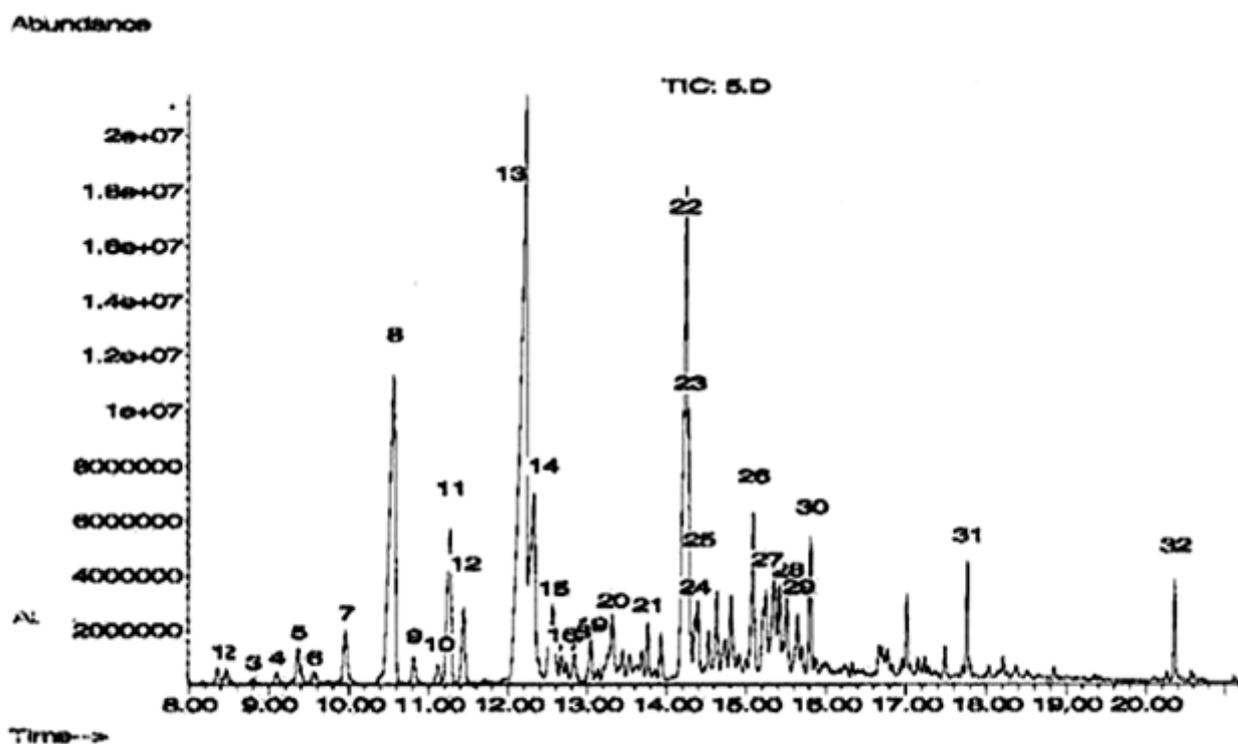


Fig. 1. Cromatograma gaseoso analítico del aceite esencial de *Conyza bonariensis*.

Tabla 4. Componentes identificados en el aceite esencial de *Croton bonariensis*

Pico número	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	8,35	β -maalieno
2	8,47	δ -elemeno
3	8,79	α -cubebeno
4	9,09	(+)-ciclosativeno
5	9,36	2,3,8,8-tetrametiltriciclo-(5.2.2.0(1,6))-undec-2-eno
6	9,56	Burkheyaraduleno
7	9,95	1-etilenil-1-metil-ciclohexano
8	10,55	Cariofileno
9	10,81	β -cubebeno
10	11,11	γ -elemeno
11	11,27	Biciclo (3.1.1)-hept-2-eno-2,6-dimetil-6-(4-metil-3-pentenil)
12	11,44	α -cariofileno
13	12,22	trans- β -farneseno
14	12,32	Germacreno-D
15	12,56	Ar-curcumeno
16	12,66	γ -muuroleno

17	12,73	Zingibereno
18	12,83	α -muuroleno
19	13,04	α -amorfenol
20	13,31	δ -cadineno
21	13,76	Germacreno B
22	14,24	Óxido de cariofileno
23	14,25	3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol
24	14,35	Furan,3-(4,8-dimetil-3,7-nonadienil)
25	14,39	Savial-4(14)-en-1-ona
26	15,08	Espatulenol
27	15,25	α -cardinol
28	15,51	Nor-copaanona
29	15,65	Cariofila-3,8(13)-dien-5 β -ol
30	15,81	Aristol-9-en-3-ol
31	17,76	Neofitadieno
32	20,36	Fitol

En la figura 2 (A y B) se presenta el cromatograma gaseoso analítico del aceite esencial de *C. bonariensis* y se observan los picos cromatográficos registrados, que relacionan los compuestos identificados y sus tiempos de retención. Se destaca la presencia de sesquiterpenos como compuestos mayoritarios y diterpenos como compuestos minoritarios.

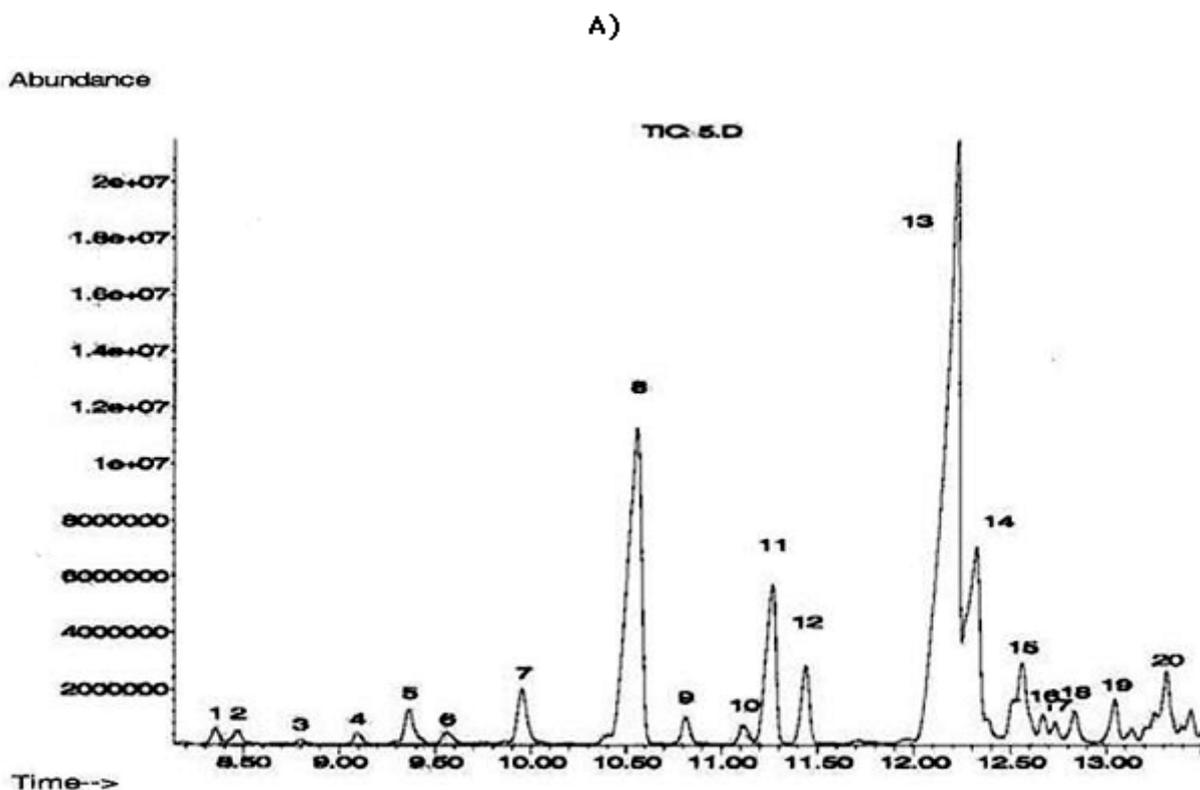


Fig. 2. Cromatograma gaseoso analítico del aceite esencial de *Conyza bonariensis*, picos cromatográficos identificados.

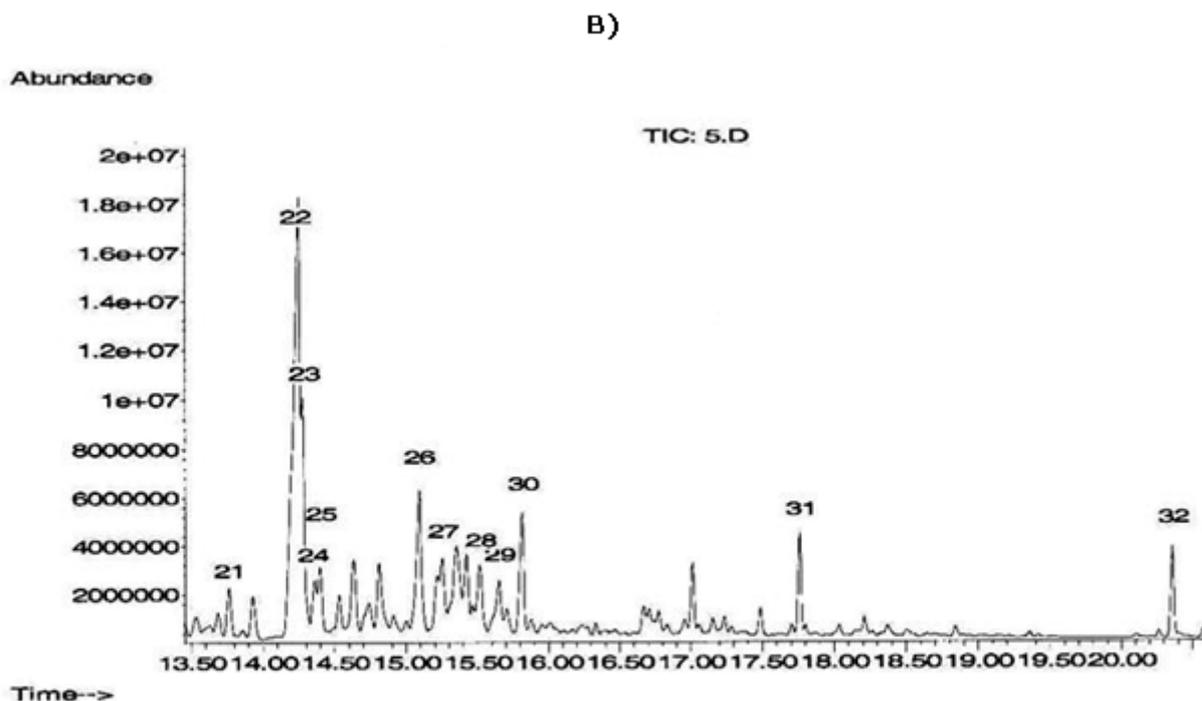


Fig. 2. Cromatograma gaseoso analítico del aceite esencial de *Conyza bonariensis*, picos cromatográficos identificados.

En la figura 3, se presenta la estructura química del sesquiterpeno: trans- β -farneseno, compuesto mayoritario identificado en el aceite extraído de las hojas de la especie.

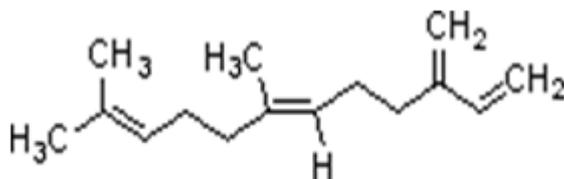


Fig. 3. Estructura química del sesquiterpeno: trans- β -farneseno.

DISCUSIÓN

Los valores encontrados en cuanto al rendimiento de aceite esencial ($0,03 \pm 0,00$ %) son muy inferiores al informado por Barbosa y otros ($0,22$ %) ⁸ de *C. bonariensis* que crecen en Brasil.

Los componentes mayoritarios identificados, en el aceite esencial, corresponden al sesquiterpeno: trans- β -farneseno y óxido de cariofileno; los de abundancia relativa se identificaron como el cariofileno (pico 8) y un alcohol alifático de cadena larga con sustituciones metílicas (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol; pico 23), y los compuestos minoritarios corresponden a los diterpenos: β -maalieno y δ -elemeno, los mismos que no han sido reportados en la literatura y que difieren de lo reportado ^{7,8} para esta especie.

En la evaluación de la actividad antiinflamatoria (bencidamida), realizada a los extractos de *C. bonariensis*, sus resultados se complementan con lo reportado en la literatura para esta planta, pero en otros modelos experimentales de inflamación;¹⁴ los mismos que indican que la planta aunque experimenta porcentajes de inhibición por debajo del patrón logra revertir el proceso inflamatorio en más de 50 %, lo cual se considera como un efecto antiinflamatorio moderado y, por tanto, pudiera tener una gran utilidad desde el punto de vista clínico en los procesos inflamatorios agudos de esa magnitud y con la garantía, además, de quizá ocasionar un menor número de reacciones adversas, como se presentó en la tabla 3.

Los componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial (sesquiterpenos) y los compuestos minoritarios (diterpenos), no han sido reportados en la literatura, y difieren de lo obtenido por *Barbosa* y otros,⁸ quienes indicaron presencia de monoterpenos como sus compuestos mayoritarios. Estos resultados permitirían dar una explicación científica al hecho empírico y tradicional de los campesinos ecuatorianos y revalorizar el conocimiento del entorno etnomédico y las propiedades medicinales de esta planta.

Sobre la base de que los resultados obtenidos sustentan el uso etnomédico, se recomienda continuar con los estudios preclínicos y clínicos necesarios para el desarrollo, la producción y comercialización de un antimicótico de origen natural, de uso externo, proveniente de los extractos alcohólicos de hojas de *C. bonariensis* que crece en Ecuador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herbario Virtual del Mediterráneo Occidental. *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. Área de Botànica, Departament de Biologia, Universitat de les Illes Balears. Disponible en: <http://herbarivirtual.uib.es/cas-ub/especie/4972.html>
2. Amsellem M, Jansen A, Driesenaar, Gressel J. Developmental Variability of Photooxidative Stress Tolerance in Paraquat-Resistant *Conyza*. *J Plant Physiol*. 1993; 103(4): 1097-106.
3. Ashbee H, Evans E. Immunology of Diseases Associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol*. 2002; 15(1):21-57.
4. Takuro K, Irimajiri J. *Pityriasis versicolor* and *Malassezia folliculitis*. *Japanese J Med Mycol*. 1999; 40(2):69-71. Disponible en: <http://sciencelinks.jp/j-east/article/199913/000019991399A0453500.php>
5. Padilla MC. *Pityriasis versicolor*. Artículo de Revisión. *Dermatología Rev Mex*. 2005; 49: 157-67. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2005/rmd054b.pdf>
6. Kong LD, Abliz Z, Zhou CX, Li LJ, Cheng CHK, Tan RX. Glycosides and xanthine oxidase inhibitors from *Conyza bonariensis*. *Phytochemistry*. 2001; 58(4):645-51.
7. Tzakou O, Vagias C, Gani A, Yannitsaros A. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. *Flavor Fragrance J*. 2005; 20(4):425-8. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/109883836/abstract>

8. Barbosa L, Paula V, Azevedo A, Silva E, Nascimento E. Essential oil composition from some plant parts of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. Flavor Fragrance J. 2005;20(1): 39-41.
9. Sanz JF, Marco JA. A new butenolide from *Conyza bonariensis*. Liebigs Annalen Chemie. 1991; 12(4): 399-400. Disponible en:
<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4990455>
10. Da Silva R, Correa M, Martins S. Determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de *Conyza bonariensis* (L.) Asteraceae. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC-Florianópolis, SC-Julio/2006. Disponible en:
http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/SENIOR/RESUMOS/resumo_157.html
11. Luján M, Pérez C. Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina. Rev Cubana Farm. 2008;42(2). Disponible en:
http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol42_2_08/far07208.htm
12. Ahmad Ch, Hussain J, Uzair M, Subhan A. Biological Studies of *Conyza* and *Euphorbia* species. J Research (Science). 2001;12(1):85-8.
13. Giusiano G, Mangiaterra M, Sosa M. Actividad antifúngica del extracto de *Conyza bonariensis* frente a *Malassezia furfur*. Comunicaciones Científicas y tecnológicas 2006. Resumen: M-025. Disponible en:
<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/03-Medicinas/2006-M-025.pdf>
14. Souza S, Ramos Meneses H. Evaluation of antiinflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. Pharmazie. 2003;58(8):582-6.
15. Norma Ramal NRSP 312. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo. La Habana: Ministerio de Salud Pública; 1991.
16. Giusiano G. *Malassezia*: Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Rev Argent Microbiol. 2006;38(1):41-8.
17. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Edema Auricular. Curso para Investigadores en el descubrimiento de nuevos medicamentos. Subprograma X: Química Fina Farmacéutica. Proyecto X-2: Síntesis de Moléculas bioactivas Análogos de productos naturales de origen Iberoamericano. Lima: Editorial CYTED; 1996. p. 83.
18. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana: Editorial Félix Varela; 2000. p. 44-9.

Recibido: 30 de mayo de 2009.
Aprobado: 6 de octubre de 2010.

Patricia Manzano Santana. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL) Km 30.5. Vía Perimetral, Campus Prosperina. Guayaquil, Ecuador. Apartado: 09-01-5863. Fax: (593-4) 2 854629. Correo electrónico: pmanzano@espol.edu.ec; manzanopatricia@hotmail.com; andrea.orellana@gmail.com