

Actividad expectorante y toxicológica de una formulación elaborada a partir de *Eucalyptus globulus* Labill, *Borago officinalis* L, Y *Sambucus Nigra* L

Expectorant and toxicological activity of a formulation made from *Eucalyptus globulus* Labill, *Borago officinalis* L., and *Sambucus Nigra* L.

Alexandra Jenny López Barrera,^I Migdalia Miranda Martínez,^I Adonis Bello Alarcón,^I Gastón García Simón^{II}

^IUniversidad de Guayaquil. Ecuador.

^{II}Universidad de La Habana. La Coronela, La Lisa. La Habana.

RESUMEN

Introducción: *Eucalyptus globulus* Labill., (eucalipto), *Borago officinalis* L. (Borraja) y *Sambucus nigra* L. (saúco) son especies vegetales de amplio uso popular por sus propiedades antitusígenas y mucolíticas.

Objetivo: evaluar los efectos farmacológico y toxicológico de un fitofármaco elaborado con el extracto de la mezcla de las tres plantas.

Métodos: a partir de las hojas secas de cada especie, se elaboraron dos extractos fluidos de las tres plantas: *E. globulus*, *B. officinalis* y *S nigra*, mezcladas en proporción 25:25:50, respectivamente, se empleó el método de percolación y como disolventes etanol de concentraciones al 30 y 70 %. Para la evaluación del efecto mucolítico se empleó el modelo de Rojo Fenol en secreciones de ratón y se ensayaron los extractos de concentraciones alcohólicas al 30 y 70 %. El estudio toxicológico se realizó al extracto de concentración alcohólica al 70 %.

Resultados: en la evaluación farmacológica se encontró que los extractos hidroalcohólicos al 30 y 70 % presentaron efecto mucolítico, con una efectividad ligeramente superior para el extracto en alcohol al 70 %. Cuando se evaluó toxicológicamente, este extracto no presentó efecto tóxico en el ensayo de toxicidad aguda a dosis límite.

Conclusiones: las formulaciones elaboradas con los extractos fluidos de las plantas empleando etanol al 30 y 70 %, mostraron efecto mucolítico en el modelo de rojo fenol en secreciones de ratón y con las condiciones experimentales del estudio. El extracto de las plantas en etanol al 70 % no presentó efecto tóxico en el ensayo de toxicidad aguda a dosis límite.

Palabras clave: *Eucalyptus globulus*; *Borago officinalis*; *Sambucus nigra*; mucolítico; toxicidad de extractos.

ABSTRACT

Introduction: *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalyptus), *Borago officinalis* L. (borage) and *Sambucus nigra* L. (elder) are plant species commonly used in folk medicine for their antitussive and mucolytic properties.

Objective: Evaluate the pharmacological and toxicological effects of a drug made with an extract obtained from a mixture of the three plants.

Methods: Two fluid extracts were obtained from dry leaves of the three species, *E. globulus*, *B. officinalis* and *S. nigra*, mixed in a 25:25:50 proportion. The method used was percolation and the solvents were 30% and 70% ethanol. The mucolytic effect was evaluated with the phenol red model in mouse secretions, and assays were conducted of the 30% and 70% alcoholic extracts. Toxicological analysis was performed on the 70% alcoholic extract.

Results: Pharmacological evaluation found that 30% and 70% hydroalcoholic extracts display a mucolytic effect, effectiveness being slightly higher in the 70% alcoholic extract. When evaluated toxicologically, this extract did not show any toxic effect in the dose-limiting acute toxicity test.

Conclusions: The formulations developed with fluid plant extracts using 30% and 70% ethanol were found to have a mucolytic effect in the red phenol model in mouse secretions under experimental test conditions. The 70% ethanolic plant extract did not have a toxic effect in the dose-limiting acute toxicity test.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; *Borago officinalis*; *Sambucus nigra*; mucolytic; extract toxicity.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la industria farmacéutica ha vuelto sus ojos hacia la naturaleza, buscando moléculas bioactivas para el desarrollo de nuevos medicamentos o simplemente su uso en la producción de fitoterápicos que podrían significar la cura o prevención de muchas enfermedades. El reino vegetal proporciona agentes con un grado de potencia farmacológica y toxicológica muy favorables y, por tanto, con márgenes terapéuticos muy adecuados.^{1,2}

Un ejemplo de este tipo de fitoterápico, empleado para afecciones de las vías respiratorias es la mezcla de las especies *Eucalyptus globulus* Labill, *Borago officinalis* L y *Sambucus nigra* L, elaborado por algunos laboratorios del Ecuador.

E. globulus, es una especie ampliamente utilizada no solo por la medicina tradicional, sino reconocida por diferentes Farmacopeas,^{3,4} y se le ha demostrado el efecto broncodilatador y expectorante a su aceite esencial, constituido fundamentalmente por 1,8-cineol.⁵ *B. officinalis* es empleada desde tiempos ancestrales en la culinaria y como especie medicinal como antigripal. En su composición posee abundantes mucílagos que sirven como demulcentes aliviando la tos. Preparados a base de flores o partes aéreas de esta especie se emplean popularmente como diurético, antiartrítico, diaforético, sedante, tónico cardíaco y antiinflamatorio, así como en resfriados, faringitis, bronquitis, flebitis y trastornos de la menopausia.⁶ *S. nigra*, contiene aceites esenciales y vitamina C entre otros componentes. La infusión de las flores secas y de las hojas, es considerada un buen remedio para las afecciones de las vías respiratorias altas, anticatarral y eficaz contra los resfriados gracias a su acción sudorífica.⁷

Teniendo en cuenta los antecedentes químicos informados para las partes aéreas de las especies, este trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos: farmacológico y toxicológico de la mezcla de los extractos hidroalcohólicos de *E. globulus*, *B. officinalis* y *S. nigra*, que se expenden como fitoterápicos en Ecuador.

MÉTODOS

Recolección, secado y molienda del material vegetal

Se utilizaron las hojas de *E. globulus*, *B. officinalis* y *S. nigra*, procedentes de la costa ecuatoriana, identificadas en la Escuela de Biología y Química de la Universidad Central del Ecuador por el Dr. Jesús Inca, secadas en estufa a 30 °C durante 48 h y trituradas a tamaño de partícula de 0,5 cm.

Obtención de los extractos fluidos

Para la obtención del extracto, se mezclaron las siguientes cantidades de cada droga: 25 g de *B. officinalis*, 25 g de *E. globulus* y 50 g de *S. nigra*, tomando elementos de formulaciones más complejas, que contienen al menos dos de estas plantas y que han sido publicadas por Vanaclocha y Cañigueral.⁶ Con la mezcla de las drogas secas se elaboraron los extractos fluidos, empleando la percolación como método de extracción^{8,9} y el etanol a concentraciones de 30 y 70 % como disolventes.

Evaluación del efecto mucolítico

Se emplearon los extractos hidroalcohólicos al 30 y 70 %, elaborados por el método de percolación a partir de la mezcla de las hojas secas de las especies objeto de estudio.

El ensayo se llevó a cabo con el empleo de ratones (OF1) SPF machos, con un peso promedio entre 25 a 30 g, los mismos procedían del CENPALAB (Centro para la Producción de Animales de Laboratorio) con su correspondiente certificado de calidad.

Los animales se aclimataron una semana antes de iniciado el experimento, en las condiciones del laboratorio. Durante este periodo de tiempo no se observaron alteraciones de conducta, signos gastrointestinales anormales u otros que pudieran denotar alguna patología en los animales que se sometieran al ensayo.

El acceso al agua y la comida fue "*ad libitum*".

Se administraron los extractos objeto de estudio por la vía oral, empleando para ello una cánula intragástrica.

Se confeccionaron cuatro grupos en igual número de cajas, de ocho animales cada uno, los que fueron debidamente identificados empleando para este fin tinta indeleble.

Los animales se distribuyeron de forma aleatoria dentro de los diferentes grupos.

En el ensayo se empleó el Modelo de rojo fenol en secreciones de ratón descrito por Engler y Szelenyi¹⁰

Los grupos formados fueron los siguientes (tabla 1).

Tabla 1. Grupos de ensayo empleado en la determinación del efecto mucolítico

Grupos	Tratamiento
I Control	Rojo fenol 500 mg/kg por vía intraperitoneal, (0,5 mL/20 g de peso corporal del ratón)
II Control (+)	Bromhexina 25 mg/kg por vía oral en un volumen de 0,6 mL/20 g de peso corporal del ratón + Rojo fenol 500 mg/kg por vía intraperitoneal (0,5 mL/20 g de peso corporal del ratón).
III Mezcla de extractos en Etanol al 30 %	Se administró por vía oral, en un volumen de 1 mL/20 g de peso corporal del ratón + Rojo fenol 500 mg/kg por vía intraperitoneal (0,5 mL/20 g de peso corporal del ratón).
IV Mezcla de extractos en Etanol al 70 %	Se administró por vía oral, en un volumen de 1 mL/20 g de peso corporal del ratón + Rojo fenol 500 mg/kg por vía intraperitoneal (0,5 mL/20 g de peso corporal del ratón).

Cada tráquea se lavó durante 30 min., en 1 mL de solución salina fisiológica, la cual se preparó en cada uno de los tubos de ensayos que se utilizaron.

Después se adicionó 0,1 mL de la solución de NaOH 1 mol/L a cada tubo de ensayo que presentaba la muestra.

La concentración de rojo fenol se determinó espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 560 nm. Para la determinación se necesitó de un blanco, el cual estaba compuesto por 1 mL de solución fisiológica y 0,1 mL de la solución de NaOH 1 mol/L.

Se calculó el porcentaje de eficacia mediante la siguiente fórmula:

$$P (\%) = 100 \frac{(X-1)}{B}$$

Dónde:

P= Porcentaje de eficacia.

X= Valor de Densidad óptica (D.O.) del animal tratado.

B= Valor de Densidad óptica (D.O.) del animal tomado como control.

Procesamiento estadístico

Los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza múltiple (ANOVA) considerando un nivel de significación del 5 % y con la ayuda del programa estadístico IBM SPSS versión 21.

Al final del ensayo se procedió a sacrificar los animales empleando para ello una atmósfera saturada de éter.

Ensayo de toxicidad aguda oral

Se siguió el procedimiento descrito en las normas de la OECD.¹¹

El ensayo se realizó en una especie roedora (rata), con un mínimo de seis animales por ensayo, tres por sexo con un peso del valor medio \pm el 20 % de este valor, pertenecientes a la línea Wistar y procedentes del CENPALAB (Centro para la Producción de animales de Laboratorio) con su correspondiente certificado de calidad.

Los animales fueron mantenidos en condiciones de cuarentena y aclimatación según lo establecido, dicho periodo tuvo una duración de cinco días como mínimo.

Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria dentro de los diferentes grupos.

A las ratas se les retiró el alimento 18 h antes de la exposición a la sustancia en prueba.

El tiempo que duro la prueba fue de 19 días, cinco de aclimatación y 14 de ensayo.

Para el ensayo se confeccionaron dos grupos tratados o sea recibieron el producto en estudio hembras y machos.

La tarde noche anterior fue retirada la comida de los animales, transcurridas las horas de ayuna se comenzó la prueba, para ello todas las ratas fueron pesadas para de esta manera hacer una dosificación exacta de acuerdo al peso de las mismas.

La sustancia que se suministró fue el producto en estudio a una concentración tal que dosificaron 2000 mg/kg.

El volumen de la solución que se suministró debió permanecer constante y no excedió de 2 mL/100 g de peso corporal, transcurridas dos a tres horas de la aplicación de la sustancia se procedió a suministrar de nuevo la comida.

Después de la administración se realizaron las observaciones, (varias veces durante el primer día y al menos una vez al día para los 13 restantes) y se registraron sistemáticamente en el record individual para cada animal.

Atendiendo a que la vía de administración fue la oral se incluyeron los signos de toxicidad retardada, la pesada de las ratas se realizó en los tiempos 0, 7 y 14 días.

Al final del ensayo se procedió a sacrificar los animales empleando para ello una atmósfera saturada de éter.

En las observaciones que se realizaron de los órganos: pulmones, corazón, bazo, riñones y estómago u otro, que durante los días de observación se manifestó los signos clínicos si se encontraba alguna afectación, entonces se tomaban muestras para su procesamiento histológico.

RESULTADOS

Evaluación del efecto mucolítico

En la evaluación del efecto mucolítico de la mezcla de los extractos (tabla 2), se apreció que el mejor resultado en cuanto al porcentaje de efectividad se obtuvo para el jarabe de Bromhexina (control +), el cual presenta reconocida actividad como expectorante a bajas dosis. Sin embargo, para el extracto de la mezcla en mensturo alcohólico al 30 %, con una dosis de 5 mg/g de peso corporal del ratón, se obtuvo una efectividad de 155,3 %; y para la mezcla en mensturo alcohólico al 70 % e igual dosis una efectividad de 175,3 %, las cuales no son despreciables y resultaron ser efectivas en comparación con el control negativo. Sin embargo, debe destacarse que aunque ambas extractos presentaron efectividad, el elaborado con etanol al 70 % fue ligeramente más efectivo.

Tabla 2. Resultado del ensayo de efecto mucolítico de los extractos de la mezcla de *B. officinalis*, *E. globulus* y *S. nigra* en menstros alcohólicos al 30 % y 70 %

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/30 g)	Efectividad (%)	D.S.
I	Control (-)	-	-	-
II	Jarabe bromhexina	0,50	224	87,8
III	Mezcla en mensturo alcohólico 30 %	150	155,3	32,10
III	Mezcla en mensturo alcohólico 70 %	150	175,3	35,18

Toxicidad aguda

En este caso se ensayó solo el extracto que resultó más efectivo en la evaluación del efecto mucolítico (70 %).

Los grupos de animales formados tenían un peso corporal medio de $244,33 \pm 4,64$ g, las hembras y $208,0 \pm 16,70$ g los machos. El análisis de varianza ANOVA 1, demostró que no existían diferencias significativas $p < 0,05$ entre los pesos corporales iniciales de los animales de un mismo sexo (tabla 3).

Tabla 3. Variación en el peso corporal de los animales en el ensayo de Toxicidad aguda oral

Grupo	Tiempo (Días)		
	0	7	14
Hembras	$244,33 \pm 4,64$ g	$256,0 \pm 8,72$ g	$269,3 \pm 7,02$ g
Machos	$208,0 \pm 16,70$ g	$264,33 \pm 3,21$ g	$273,0 \pm 3,61$ g

Pudo apreciarse que tanto en el caso de los machos, como de las hembras hubo aumento del peso, aunque el análisis de varianza arrojó que estas no eran significativas $p < 0,05$.

Durante el período de ensayo, no se apreció letalidad, ni signos tóxicos.

En las mediciones de los reflejos flexores, homolateral, pineal, corneal y la respuesta al sobresalto, indicativos de las funciones sensoriales y motoras, no se apreciaron diferencias significativas $p < 0,05$ entre grupos tratados y controles.

Según el protocolo de ensayo, tras catorce días de observación los animales se sacrificaron, se les practicó la necropsia y se tomaron los siguientes órganos: estómago, intestino, hígado, riñones, pulmón, corazón, gónadas y glándulas adrenales, para su estudio histopatológico, no se encontraron alteraciones microscópicas en ninguno de los órganos analizados. De manera general, no se detectó letalidad ni otro signo de toxicidad retardada en los animales tratados con el extracto de la mezcla de drogas, lo cual permite ubicarla en la categoría prácticamente inocuo. Se debe destacar que no existen antecedentes sobre la evaluación toxicológica de extractos hidroalcohólicos de la mezcla de estas especies.

DISCUSIÓN

El método *in vitro* del rojo fenol para evaluar la actividad mucolítica se basa en las propiedades que presenta este colorante para eliminarse en los fluidos del tracto respiratorio, lo que permite medir el efecto de sustancias que alteran las propiedades físicas del mucus o su aclaramiento mucociliar.¹⁰

La bromhexina es un secretolítico, es decir, aumenta la producción de moco seroso en el tracto respiratorio y hace que la flema sea delgada y menos pegajosa. Esto contribuye a un efecto secretomotor, ayuda a los cilios a transportar la flema de los pulmones. Esta actividad quedó demostrada al producirse un incremento en la concentración de rojo fenol en las secreciones traqueobronquial del ratón en los extractos de la mezcla con mensturo alcohólico al 30 y 70 % respectivamente, resultando más elevado el valor en el extracto de la mezcla que empleó como mensturo el etanol al 70 %. Un estudio similar fue realizado por Bázaga y col,¹² con jarabes y tabletas (obtenidos a partir de extractos acuosos y alcohólicos), de la especie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (orégano francés) estos autores demostraron que la administración de extracto acuoso y el extracto fluido, así como

de los jarabes de los extractos produjeron incrementos significativos de la concentración de rojo fenol en la secreción traqueobronquial de ratón. Tanto el extracto acuoso como el hidroalcohólico presentaron actividad expectorante; el jarabe preparado con extracto acuoso fue efectivo a dosis de 50 mL/kg, con una dosis efectiva media de 41,91 mL/kg; el jarabe preparado con extracto fluido fue efectivo a dosis de 50 y 37,5 mL/kg, con dosis efectiva media de 34,64 mL/kg; y las tabletas de 100 mg ejercieron efecto expectorante a las dosis de 34 y 68 mg/kg. A su vez la administración aguda de tabletas de 100 mg ejerció un efecto expectorante, similar al de la bromhexina y el salbutamol.

En un estudio realizado por Córdor¹³ a seis plantas medicinales (*Schinus molle*, *Jacaranda mimosifolia*, *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis*, *Marrubium vulgare* y *Dalea coerulea*), empleando el mismo método, se demostró que sólo *Rosmarinus officinalis* y *Zingiber officinale*, presentaban efecto expectorante y que las restantes no presentaban dicho efecto.

Para la mezcla de las especies estudiadas, no se informan estudios anteriores. Por otra parte, se demostró que el extracto de la mezcla de drogas en etanol al 70 %, puede ubicarse la categoría de prácticamente inocuo, al no presentar efecto tóxico a la dosis de 2000 mg/kg de peso de la rata, dato que se informa por primera vez para este tipo de producto fitoterapéutico.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cañigueral S. La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? Revista de Fitoterapia. 2002;2(2):101-21.
2. Cañigueral S, Vila R. La Fitoterapia racional. En: Vanaclocha B, Cañigueral S (Eds.) Fitoterapia: Vademécum de prescripción. 4ª Ed. Barcelona: Editorial Masson. 2003; 15-27.
3. Farmacopea Vegetal Caribeña. 3ª Ed. Mérida, Yucatán, México. 2014; 210-3.
4. Real Farmacopea Española 5ta Edición y 2ª edición del Formulario Nacional. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios AEMPS. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2015.
5. WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva. ISBN 924 1545372; 97, 2003.
6. Vanaclocha B, Cañigueral S. (Eds). Fitoterapia, Vademécum de Prescripción, 4ª edición. Barcelona. ISBN 9788445812204, 1092 pp, Masson, 2003.
7. Rzedowski, G.C. de, J. Rzedowski. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México; 2001.

8. Miranda, M., Cuéllar, A. Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales. UH. Instituto de Farmacia y Alimentos. Ciudad Habana. 2001; 34-49.
9. Miranda M, Cuéllar A. Farmacognosia y Química de Productos Naturales. Editorial Félix Varela. 2da Edición. 2012; 127-30.
10. Engler H, Szelenyi I. Trácela phenol red secretion, a new method for screening mucosecretolityc. J. Pharmacol. Meth. 1984; 11: 151-57.
11. OECD. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (Guidance document on acute oral toxicity testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 24, July 2001. Disponible en: [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/NT00004CE6/\\$FILE/JT00111082.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/NT00004CE6/$FILE/JT00111082.PDF)
12. Barzaga P; Tillán J; Marrero G; Carrillo C; Bellma A; Montero C. Expectorant activity of formulations from *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng (French oregano). Ciudad de la Habana. Rev Cubana Plant Med. 2009; 14(2). ISSN 1028-4796.
13. Córdor GP. Evaluación de la actividad expectorante de molle (*Schinus molle* L.), iso (*Dalea coerulea*), jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), jengibre (*Zingiber officinale*), romero (*Rosmarinus officinalis*), marrubio (*Marrubium vulgare*), en ratones (*Mus musculus*). Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador. 2014.

Recibido: 22 de febrero de 2016.
Aprobado: 29 de octubre de 2016.

Migdalia Miranda Martínez. Universidad de Guayaquil. Ecuador. Correo electrónico: migdaliimiranda@hotmail.com