

Potencialidades fitoquímicas y antioxidantes de especies vegetales cubanas para el tratamiento de recuperación del COVID-19.

Onel Fong Lores¹

Clara Azalea Berenguer Rivas²

Diana Julia Arró Díaz¹

Rosalía González Fernández¹

Ania Ochoa Pacheco²

Julio César Escalona Arranz²

¹ Centro de Toxicología y Biomedicina, Departamento Bioquímica Clínica, Santiago de Cuba, Cuba, onelfong@gmail.com

² Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Farmacia, Santiago de Cuba, Cuba, clazalea2017@gmail.com

¹ Centro de Toxicología y Biomedicina, Consultoría Fármaco-Toxicológica, Santiago de Cuba, Cuba, dianajuliaarro@gmail.com

¹ Centro de Toxicología y Biomedicina, Consultoría Fármaco-Toxicológica, Santiago de Cuba, Cuba, rosaliagonzalez.9110@gmail.com

² Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Farmacia, Santiago de Cuba, Cuba, aochoap@gmail.com

² Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Farmacia, Santiago de Cuba, Cuba, jcea@uo.edu.cu

Resumen: Dada la magnitud de la pandemia de COVID-19, las necesidades de atención médica para los pacientes con secuelas de esta enfermedad continuarán aumentando en el futuro inmediato. Hacer frente a este desafío requerirá la optimización de la infraestructura sanitaria, el desarrollo de modelos de atención médica orientados a la integración multidisciplinar para mejorar la salud de los supervivientes de COVID-19 a largo plazo. Habiendo estudiado las publicaciones disponibles sobre los mecanismos de daño a los tejidos y órganos de pacientes con COVID-19, así como las estrategias de tratamiento disponibles, se propone investigar desde la base de su caracterización fitoquímica y sus propiedades antioxidantes las especies vegetales *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw como potenciales fitofármacos para el tratamiento de recuperación de pacientes con COVID-19. Las composiciones químicas de los extractos de las plantas muestran importantes metabolitos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias reconocidas, que pueden ser valoradas en estudios preclínicos y clínicos posteriores para su uso en el tratamiento de recuperación de las secuelas de esta enfermedad.

Palabras clave: fitoquímica, antioxidante, *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw, COVID-19

INTRODUCCION

La pandemia de COVID-19 ha impactado gravemente en la población mundial, con una gran tasa de morbilidad y mortalidad. Si bien la evidencia hasta la fecha ha intentado definir la clínica de la enfermedad aguda, informes recientes también han comenzado a describir síntomas persistentes que se extienden más allá del período inicial de la enfermedad. Se ha encontrado que los resultados adversos, además de respiratorios, se presentan a diferentes niveles: cardiovascular, neurológico o inmunológico, manifestaciones cutáneas, gastrointestinales o renales. La investigación clínica en el contexto actual de la pandemia, centra su atención en buscar las diferentes formas y alternativas de lograr la recuperación de los pacientes afectados por la enfermedad.

El daño tisular provocado por el COVID-19 se asocia con el desarrollo de una fuerte inflamación sistémica, acompañada de estrés oxidativo. Al igual que otros virus, el SARS-CoV-2 estimula la producción masiva de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6 e IL-8, denominadas “tormenta de citoquinas”, que es responsable del daño del tejido pulmonar y provoca la muerte celular. La importancia del estrés oxidativo en COVID-19 también se ve reforzada por el papel de la producción de EROs en las comorbilidades asociadas. Muchos estudios destacaron la importancia de las vías redox como nuevos objetivos para terapias destinadas a bloquear tanto la replicación viral como la inflamación inducida por el virus. Se reportan evidencias en animales de experimentación de la participación de la maquinaria del estrés oxidativo, con aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y debilitamiento de los mecanismos de defensa. Lo que sugiere que la sobreproducción de EROs y la privación del sistema antioxidante también juegan un papel importante en la patogénesis y en la pronta recuperación de los pacientes que han padecido infecciones por SARS-CoV y SARS-CoV-2, así como en la progresión y gravedad de las enfermedades relacionadas. (1)(2)

Los eritrocitos son dianas críticas para los productos naturales y muchos otros fármacos. De hecho, los eritrocitos humanos se han utilizado como modelo para estudiar los efectos biológicos del estrés oxidativo inducido por especies reactivas de oxígeno por varias razones. Están continuamente expuestos a altas tensiones de oxígeno; los lípidos de la membrana contienen cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados que son vulnerables a la peroxidación, y tienen sistemas enzimáticos antioxidantes. Además, son estructuralmente simples y pueden obtenerse fácilmente. En este contexto, varios estudios han demostrado la utilidad del método de estabilidad de la membrana de los glóbulos rojos humanos in vitro como una excelente estrategia para explorar el papel citoprotector de los productos naturales. (3)

En los últimos años, en Cuba se ha introducido la medicina natural y tradicional (MNT) como alternativa terapéutica del sistema de salud. El uso adecuado de estos métodos o técnicas terapéuticas, amplía de manera significativa las posibilidades de los profesionales de salud en el trato diario de los pacientes. En la región oriental del país se han identificado un grupo de plantas con un gran potencial farmacológico, algunas de las cuales han sido tradicionalmente usadas por nuestra población y que en muchos de los casos no poseen toda la evidencia científica que avalen su uso o registro como una nueva formulación de fitofármaco. Las especies vegetales *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw de reconocidas propiedades antioxidan-

tes y/o antiinflamatorias podrían resultar posibles candidatos a futuros fitofármacos en el tratamiento del COVID-19. (4)(5)

Objetivo: Evaluar el potencial fitoquímico y antioxidante de las especies vegetales *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw para el tratamiento de pacientes en recuperación por COVID-19.

I. MÉTODO

Las partes aéreas de *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw fueron recolectadas en la Reserva Ecológica Siboney-Juticí (Latitud: 19,9603 y Longitud: -75,7081), ubicada en las afueras de la ciudad de Santiago de Cuba. Las plantas fueron identificadas taxonómicamente en diferentes momentos por especialistas del Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO, Santiago de Cuba) y un espécimen de cada una está almacenado en el herbario de la institución con los números de registro 14780, 154 7384 y 21660 respectivamente.

A. Determinación principales parámetros farmacognósticos.

Tomando en consideración que las especies no cuenta con estudios farmacognósticos previos, clasifican como una droga no oficial; se determinaron los principales parámetros farmacognósticos (descripción macromorfológica, humedad residual, cenizas totales, aceites esenciales) para establecer la autenticidad y calidad del material vegetal recolectado. De cada planta se prepararon diferentes extractos a los cuales se les realizó la caracterización físico-química según lo establecido por las Normas Ramales de Salud Pública (NRSP # 309 y 310). (4)(5)

B. Determinación cualitativa de metabolitos en los extractos totales.

Para la determinación cualitativa de metabolitos en los extractos totales se emplearon las reacciones químicas descritas en la técnica de Tamizaje Fitoquímico para las siguientes clases de metabolitos secundarios: Alcaloides (Mayer, Wagner), Triterpenos y esteroides (Liebermann-Burchard, Solkowski), Quinonas (Borntrager y variante con benceno), Cumarinas (Baljet), Saponinas (espuma), Azúcares reductores (Fehling y Benedict), Fenoles y taninos (cloruro férrico), Carbohidratos (Molish), Aminoácidos y aminas (ninhidrina), Flavonoides (Shinoda, ácido sulfúrico concentrado y álcalis). (4)

Para la determinación cuantitativa de metabolitos en los extractos se determinó el contenido de fenoles totales por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, la cuantificación del contenido de flavonoides totales se realizó empleando el método de reacción con el Cloruro de Aluminio y la determinación de azúcares reductores se llevó a cabo por el método de Miller, utilizando el ácido 3,5-dinitrosalicílico. (5)

La presencia de metabolitos activos de importancia se realizó por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa (GC/MS) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Arreglo de Diodos (HPLC/DAD). (3)(5)

C. Determinación de la actividad antioxidante.

Actividad frente a los radicales 2,2-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS•) y el radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•)

Se desarrolló según la metodología desarrollada por Choi para el radical ABTS• y por Shimada para el DPPH•. A soluciones de cada extracto entre 62,5-1000 µg/mL en base a los sólidos totales se le añaden 3 mL de solución de ABTS•. De igual forma para el DPPH•, se emplearon las mismas concentraciones de los extractos, a los que se añadió 1,5 mL de la solución de DPPH•. La mezcla se agitó y se mantuvo en la oscuridad durante 20 minutos. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 734 nm para el ABTS• y a 517 nm para el DPPH•. Como control positivo una solución de ácido ascórbico a concentración de (1mg/mL). La capacidad antioxidante contra estos radicales se estimó en función de las concentraciones de los extractos al inhibir el 50% de los radicales (CI₅₀). (4)(5)

Actividad antioxidante estabilizadora de la membrana eritrocitaria.

El ensayo se realizó midiendo la inhibición de la hemólisis oxidativa inducida por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en RBC, siguiendo el método reportado por Escalona-Arranz, con algunas modificaciones. Las suspensiones de eritrocitos fueron tratadas con PBS, H₂O₂ (10 mM) (control negativo), ácido ascórbico (control positivo), y extractos de las plantas estudiadas en un rango de 8-256 µg/mL. Todos los grupos experimentales se incubaron a 37 °C durante 1 hora y se agitaron con un vórtex cada 10 minutos. Después, las muestras se centrifugaron, se recogieron los sobrenadantes y se midieron las absorbancias a 530 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó asumiendo un 100% de hemólisis en el control negativo (H₂O₂). La concentración en la que los extractos protegen el 50% de la integridad de la membrana del glóbulo rojo (IC₅₀) se estimó utilizando el logaritmo de la concentración mediante un enfoque de regresión lineal. (3)

Cambios morfológicos de los eritrocitos.

Para determinar el mecanismo por el cual los extractos protegen la membrana de los eritrocitos, se observaron los cambios morfológicos inducidos por el H₂O₂ como agente oxidante en los glóbulos rojos. Un volumen de 50 µL de RBC de los pellets de cada experimento se añadió a una cámara de Neubauer y se visualizó en un microscopio de luz transmitida (Leica DM 1000, Suiza) acoplado a una cámara digital. Se consideró la integridad de la membrana; la forma de los eritrocitos; la presencia/ausencia de deformaciones como esferocitos, equinocitos y otras alteraciones morfológicas para todas las muestras de ensayo y los controles. (3)

II. RESULTADOS

Durante el proceso de recuperación de las secuelas provocadas por la infección por el SARS-CoV-2, además de mantener el estado de salud general de los pacientes afectados, la línea de tratamiento puede centrarse en adaptar las estrategias, incluido el uso de la medicina natural y tradicional que puedan suprimir el estrés oxidativo en curso, la inflamación aguda y la tormenta de citoquina para evitar la destrucción y el daño causado a los tejidos afectados, así como su recuperación. (6)

Las plantas *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw a pesar del uso tradicional en la región oriental de Cuba, aun no poseen todas las evidencias científicas que avalen su efectividad y seguridad para la formulación de fitofármacos que puedan ser comercializados y empleados por el sistema nacional de salud, sin embargo, los primeros hallazgos experimentales vislumbran resultados prometedores en este sentido. El análisis macromorfológico de ambas plantas se recogen en la tabla 1 resultados que coinciden con reportes bibliográficos, lo que permite corroborar, conjuntamente con la identificación taxonómica, que son las especies vegetales *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw .

Tabla 1. Análisis macromorfológicos de las plantas *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw.

Parámetros determinados del Análisis macroscópico	Órgano vegetal (HOJA)	
	<i>Adelia ricinella</i> L	<i>Gymnanthes lucida</i> Sw
Forma	Hojas simples, fasciculadas en los nudos	Hojas alternas, oblongas a lanceolado-espátuladas
Color de haz	color verde lustroso	color verde oscuro
Color del envés	color verde claro	verde menos intenso por el envés
Pecíolo	pecioladas cortas, caedizas	pecioladas
Ápice	ápice retuso o redondeado	ápice agudo
Base	agudo en la base	Agudo en la base
Nervadura	nervadura pinnada	nervadura penninervia
Textura	consistencia membranosa debido al estrés hídrico al que están expuestas	consistencia coriácea debido al estrés hídrico al que están expuestas

Los tamizajes fitoquímicos de los extractos etanólicos obtenidos de estas plantas se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química cualitativa de los extractos de *A. ricinella* y *G. lucida*.

Metabolitos	<i>A. ricinella</i>	<i>G. lucida</i>
Alcaloides	+++	++
Triterpenos y esteroides	+	+++
Quinonas	+	+++
Cumarinas	+	+++
Saponinas	+	-
Azúcares reductores	+	++
Fenoles y Taninos	+	+
Aminoácidos libres y aminos	+	-
Carbohidratos	+	-
Flavonoides	+	+

Legenda: (+++) indica evidencia positiva marcada, (++) indica evidencia positiva clara, (+) indica evidencia positiva, (-) indica resultado negativo.

Por otra parte, la caracterización química cuantitativa de los extractos se realizó en base a la determinación de las concentraciones de algunos metabolitos secundarios identificados en el análisis de la composición química cualitativa que pudieran conferirle actividad antioxidante a los mismos, como son los fenoles,

los flavonoides y los azúcares reductores totales. Los resultados obtenidos, así como el valor medio y la desviación estándar (D.E) de estos se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración de fenoles totales, flavonoides totales y azúcares reductores presentes en extractos de *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw.

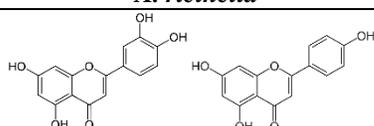
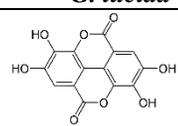
Metabolitos	<i>A. ricinella</i>	<i>G. lucida</i>
Fenoles totales (mg AG/g)	967,9 ± 71,8	687,9 ± 0,8
Flavonoides totales (mg Q/g)	19,29 ± 1,09	113,82 ± 0,001
Azúcares reductores (mg G/g)	809,1 ± 3,66	318,52 ± 0,003

Leyenda: AG (ácido gálico), Q (quercetina), G (glucosa)

Varios estudios han revelado que el contenido fenólico en las plantas está asociado con su actividad antioxidante, probablemente debido a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y aceptores de electrones desapareados de oxígeno. Los flavonoides son constituyentes de las plantas muy valiosos en la captura de radicales libres debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos presentes en su estructura. Sus efectos protectores se han atribuido a su capacidad de transferir electrones a los radicales libres, la quelación de catalizadores metálicos, la activación de enzimas antioxidantes, inhibición de oxidasas, reducción de radicales de α -tocoferol y la mitigación del estrés oxidativo causado por el óxido nítrico. Por su parte en los azúcares reductores la presencia en su estructura del grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, les permite reaccionar como reductores contra otras moléculas. (6)(7)

En la Tabla 4 se pueden observar los principales metabolitos y sus estructuras químicas, identificados a través de los métodos cromatográficos. Ambas plantas presentan una rica composición en compuestos fenólicos (Tabla 3). En la especie *Adelia ricinella* L se identificaron las flavonas luteolina y apigenina las cuales son estructuralmente muy similares: la luteolina tiene cuatro grupos hidroxilos (-OH) unidos a las posiciones 5, 7, 3' y 4', siendo el grupo hidroxilo en la posición 3' el que distingue a este de la apigenina, que carece del patrón 3'-OH. Las flavonas se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre C2 y C3 y un grupo cetona en la posición 4 del anillo C, lo que le confiere una conformación planar y una alta deslocalización de electrones confiriéndole propiedades antioxidantes. Por su parte la especie *Gymnanthes lucida* Sw contiene el compuesto fenólico ácido elágico, el cual gracias a su estructura química es capaz de mantener la homeostasis celular y la respuesta antioxidante no solo actuando como modulador redox mediante el secuestro de radicales libres sino también estimulando mecanismos celulares de reposición de equivalentes reducidos que respaldan la respuesta antioxidante enzimática. (3)(4)(5)

Tabla 4. Metabolitos identificados en los extractos empleando GC/MS y HPLC/DAD.

Metabolitos	<i>A. ricinella</i>	<i>G. lucida</i>
	 <p>Luteolina y Apigenina</p>	 <p>Ácido Elágico</p>

Estudios recientes se han centrado en las vías redox como nuevos objetivos para terapias diseñadas en detener tanto la inflamación inducida por virus y acelerar el proceso de restauración de la homeostasis de los tejidos. Dado que los virus respiratorios no solo activan la producción de EROs sino que también perjudican los sistemas de defensa celular, el uso de secuestradores de radicales se ha considerado durante mucho tiempo como un posible enfoque terapéutico. (6)(7) En la Tabla 5 se puede apreciar los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria media) de los extractos etanólicos de las plantas *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw contra los radicales ABTS[•] y DPPH[•].

De igual forma investigaciones promueven modelos relacionados con los glóbulos rojos para evaluar la acción de los antioxidantes, ya que son muy susceptibles al daño oxidativo. Los extractos de ambas especies mostraron efecto sobre la protección de la membrana del RBC, al evaluar la inhibición de la hemólisis oxidativa inducida por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tal como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de CI_{50} de los extractos de *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw en los ensayos de inhibición de los radicales (ABTS[•] y DPPH[•]) y de la hemólisis inducida por peróxido de hidrógeno sobre los eritrocitos humanos (RBC).

Ensayos	<i>A. ricinella</i>	<i>G. lucida</i>	Ácido Ascórbico
ABTS CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$32,02 \pm 0,01$	$13,83 \pm 3,45$	$86,35 \pm 0,02$
DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$65,12 \pm 0,22$	$12,82 \pm 0,12$	$12,27 \pm 0,28$
RBC CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$17,49 \pm 1,87$	$16,58 \pm 1,57$	$10,36 \pm 1,28$

El seguimiento de la morfología externa de los eritrocitos puede considerarse una herramienta valiosa para medir el grado de daño causado por agentes nocivos. Al mismo tiempo, las sustancias que actúan como agentes protectores de los eritrocitos pueden evitar dichas deformaciones. [3]

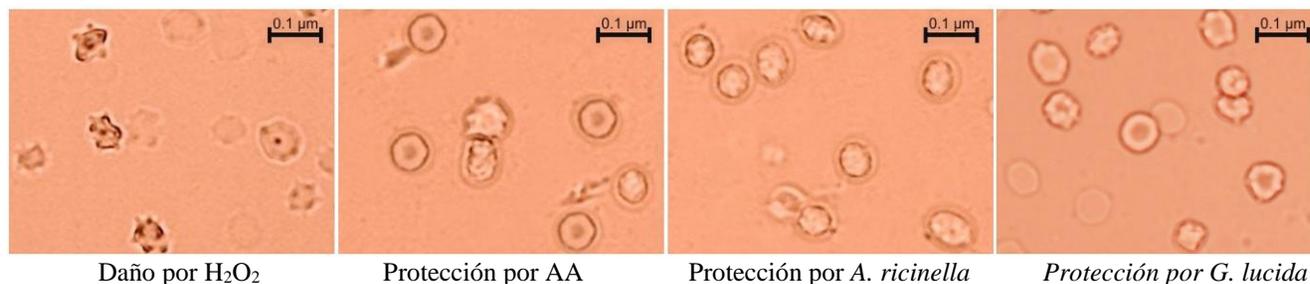


Figura 1. Microfotografías ópticas del efecto protector de los extractos y el estándar antioxidante ácido ascórbico (AA) contra daño oxidativo inducido por H_2O_2 sobre las membranas de los eritrocitos. Magnificación 40X.

La actividad estabilizadora de la membrana eritrocitaria de los extractos evaluados se exploró con H_2O_2 como agente oxidante. Los resultados coincidieron con las determinaciones espectrofotométricas, indicando que los extractos de estas especies vegetales protegieron a los eritrocitos de alteraciones en la morfología de sus membranas. Las principales deformaciones se asociaron a la presencia de esferocinocitos, equinocitos y formas de esferocitos (Figura 1).

Los extractos de *Adelia ricinella* L y *Gymnanthes lucida* Sw han demostrado su capacidad de reducir las alteraciones hematológicas y el daño celular al participar en la prevención del estrés oxidativo. Por lo tanto,

estas especies vegetales podrían ser consideradas como una fuente natural de estabilizadores de membrana, siendo capaz de proporcionar un remedio alternativo para el manejo y tratamiento de trastornos y enfermedades relacionadas con la inflamación provocada por el COVID-19.

III. CONCLUSIONES

La relación entre el contenido de fenoles/flavonoides y la acción antioxidante de los extractos vegetales evaluados se ha asociado a la potencialidad de estas plantas como alternativa terapéutica al tratamiento de pacientes convalecientes del COVID-19. Tomando en consideración la Ruta Crítica de Investigación en Plantas Medicinales establecida en Cuba, aún queda camino por recorrer para llegar a la formulación final de fitofármacos seguros y eficaces a partir de estas plantas, pero no cabe duda de que estos resultados sientan las bases para las investigaciones preclínicas y clínicas que deben realizarse para cumplimentar este proceso de manera satisfactoria.

REFERENCIAS

1. Fratta Pasini AM, Stranieri C, Cominacini L, Mozzini C. Potential Role of Antioxidant and Anti-Inflammatory Therapies to Prevent Severe SARS-Cov-2 Complications. *Antioxidants*. 2021; 10(2): 272-303.
2. Vardakas P, Skaperda Z, Tekos F, Kouretas D. ROS and COVID. *Antioxidants*. 2022; 11(2): 339-341.
3. Berenguer-Rivas CA, Lores OF, Escalona-Arranz JC, de la Vega-Acosta J, Arro-Díaz DJ, Guisado-Bourzac F, Morris-Quevedo HJ. Cytoprotective activity of extracts from *Adelia ricinella* L. aerial parts. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2021; 9(6): 892-904.
4. Berenguer-Rivas CA, Mas-Ortiz M, Batista-Corbal PL, Costa-Acosta J, Escalona-Arranz JC. Chemical composition and in-vitro antioxidant activity of extracts of *Adelia ricinella* L. *Revista Cubana de Química*. 2018; 30(2): 191-210.
5. Arró-Díaz DJ, Castelnaux-Ochoa N, Ochoa-Pacheco A, Do-Nascimento YM. Antioxidant activity of bioactive compounds isolated from leaves and bark of *Gymnanthes lucida* Sw. *Revista Cubana de Química*. 2021; 33(1): 22-39.
6. DE Flora S, Balansky R, LA Maestra S. Antioxidants and COVID-19. *J Prev Med Hyg*. 2021 Jun 5; 62(1 Suppl 3): E34-E45.
7. El-Missiry MA, Fekri A, Kesar LA, Othman AI. Polyphenols are potential nutritional adjuvants for targeting COVID-19. *Phytotherapy Research*. 2021; 35(6): 2879-2889.