

POTENCIAL ANTIATEROGENICO Y RELACION CON EL PERFIL CROMATOGRÁFICO EN PLANTAS MEDICINALES DE AMPLIA COMERCIALIZACIÓN EN COLOMBIA

ANTIATHEROGENIC POTENTIAL AND RELATION WITH CHROMATOGRAPHIC PROFILE IN MEDICINAL PLANTS HIGHLY COMMERCIALIZED IN COLOMBIA

Julián Londoño^{1,2}, Guillermo Montoya^{1,3}, Gabriel Jaime Arango^{1,4}

Resumen

En este trabajo se evaluó la capacidad inhibidora de la oxidación de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) y la actividad captadora de radicales libres de tres especies de plantas medicinales con alta demanda de comercialización en Colombia: *Calendula officinalis*, *Passiflora mollissima*, *Cynara scolymus*. Se establecieron relaciones entre el perfil cromatográfico y la actividad biológica de materiales obtenidos de casas comercializadoras locales y colectados en campo.

Palabras clave: lipoproteínas de baja densidad (LDL), actividad captadora de radicales libres, *Calendula officinalis*, *Passiflora mollissima*, *Cynara scolymus*

Abstract

In this work, was evaluated the activity for inhibit the oxidation of Low Density Lipoprotein (LDL) and free radical scavenger activity of three medicinal plants highly commercialized in Colombia: *Calendula officinalis*, *Passiflora mollissima*, *Cynara scolymus*. Relation between chromatographic profile and biological activity was established for plant material from local market and collected in field.

Key word: Low Density Lipoprotein (LDL), free radical scavenger activity, *Calendula officinalis*, *Passiflora mollissima*, *Cynara scolymus*.

INTRODUCCIÓN

Debido al envejecimiento progresivo de nuestras sociedades, es de esperar que la patología cardiovascular siga teniendo un alto impacto sanitario y socioeconómico en las próximas décadas. Esto obliga a la búsqueda de un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares de estas enfermedades y

al desarrollo de técnicas que permitan explorar nuevas fuentes terapéuticas. Sin embargo en los países en desarrollo gran parte de la población no puede acceder a los medicamentos y continúan utilizando sus propios sistemas de medicina tradicional basada principalmente en plantas, siendo importante aprovechar esta información para la investigación científica y clínica tanto de los principios activos

¹ Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB). SIU, Universidad de Antioquia. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia.

Correos electrónicos: ¹<jlondono@farmacia.udea.edu.co>; ² <gmontoya@farmacia.udea.edu.co>; ³ <gjarango@farmacia.udea.edu.co>.

como de las llamadas terapias herbales (Tyler, 1999); esto implica un uso sustentable de la biodiversidad en la búsqueda de una mejor calidad de vida y disminución en el costo del tratamiento de graves problemas de salud como las enfermedades cardiovasculares (isquemia, infarto agudo a miocardio, accidente cerebrovascular). Dichas enfermedades ocupan el primer lugar entre las causas de mortalidad en el mundo, por encima de las enfermedades infecciosas, VIH/SIDA, neoplasias y diabetes (WHO, 2002).

Precisamente en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de estas enfermedades, se ha evidenciado la "Hipótesis de modificación oxidativa de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL)", según la cual la aterosclerosis es iniciada y promovida por la oxidación de LDL, conduciendo a la modificación de la Apolipoproteína B, específicamente a la formación de residuos de lisina con productos de la peroxidación lipídica, lo que conlleva a que la partícula de LDL sea reconocida por el receptor scavenger de macrófagos, produciendo células espumosas cargadas de colesterol, que darán origen a la placa ateromatosa. Estas modificaciones oxidativas en la ApoB, encontradas en lesiones *in vivo* y generadas *in vitro*, pueden ser evidenciadas mediante algunos cambios fisicoquímicos e inmunológicos de la LDL tales como el aumento en la electronegatividad y reactividad frente a anticuerpos monoclonados (Anti LDLox) (Hamilton et al., 1997; Hessler et al., 1979, 1983; Morel et al., 1983).

Por lo tanto esta investigación plantea la utilización de una técnica de aislamiento de LDL e inhibición de su oxidación *in vitro*, para medir potencial antiaterogénico de extractos de plantas aprobadas para uso medicinal y con amplia comercialización en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. *Calendula officinalis*, *Passiflora mollissima* y *Cynara scolymus*, fueron obteni-

das de dos fuentes: casas locales comercializadoras de extractos vegetales y plantaciones de cultivos orgánicos del Oriente antioqueño (Naturagro).

El material vegetal seco y molido, es almacenado, rotulado y sometido a extracción en etanol a 70 °C hasta agotamiento, los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida y luego fueron almacenados en frascos de vidrio ámbar, protegidos de la luz directa, bajo atmósfera de nitrógeno, a 4 °C hasta el momento de los ensayos.

Perfil cromatográfico. Fueron preparadas soluciones de trabajo de cada extracto, desarrolladas en cromatoplasmas F₂₅₄ en los sistemas de elución y con los reveladores recomendados en el *Plant Drugs Analysis* (Wagner y Bladt, 2001).

Actividad Captadora de Radicales Libres. Se evaluó la actividad captadora de radicales libres de los extractos estudiados utilizando el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil), el cual consiste en la decoloración estequiométrica del radical libre DPPH de coloración violeta en solución metanólica que absorbe radiación fuertemente a 517 nm y contiene un electrón desapareado que se estabiliza en presencia de antioxidantes primarios (Brand-Williams, 1995).

Las soluciones de trabajo de cada extracto fueron desarrolladas por duplicado en placas de cromatografía F₂₅₄ (10 x 2) utilizando los solventes indicados en el *Plant Drugs Analysis*. Una solución metanólica de DPPH (0,02%) fue utilizada como revelador, regiones de decoloración sobre un fondo violáceo desarrolladas en el transcurso de 5 minutos fueron tomadas como indicativo de actividad captadora de radicales libres.

Aislamiento de LDL. La fracción de LDL se aisló por ultracentrifugación, aplicando gradiente discontinuo de densidad (Wilson, 2002). Se obtuvieron 50 ml de plasma de voluntarios sanos, no fumadores (20-25 años) que fueron tratados por centrifugación a 2.500 rpm y 4 °C con citrato de sodio como

anticoagulante (10,6 mmol citrato de sodio/ml de sangre). La fracción Quilomicrones-VLDL se obtuvo adicionando 1,6 ml de NaCl (1.006 g/ml) sobre 3,2 ml de plasma y centrifugando a 49.500 rpm a 5 °C por un periodo de 12 horas y con desaceleración lenta. Se retiró la fracción superior (1,6 ml), se adicionó 1,6 ml de KBr (1,18 g/ml) y se centrifugó nuevamente a las condiciones iniciales pero en un periodo de 18 horas. SDS-PAGE fue usada para confirmar la pureza de las fracciones colectadas (Quilomicrones, VLDL, LDL y HDL). La fracción proteica de LDL fue cuantificada por el ensayo estándar para espectrofotometría del Protein Quantification Kit-Rapid (Fluka).

Oxidación de la LDL y ensayo de movilidad electroforética. LDL (373 mg/ml, 80 ml) se preincubaron con 10 ml de extracto durante 15 minutos, la oxidación se inicia con la adición de CuSO_4 (100 m) y calentamiento a 37 °C durante 15 horas. La oxidación fue detenida por la adición de 5.0 ml de una solución 1% de EDTA y enfriamiento en un baño de hielo por 15 minutos. El daño de la fracción proteica (Apo B 100) fue evaluado por la migración

diferencial en electroforesis en gel de agarosa (0,8%) corrido en buffer barbital 0,05 M, pH 8,6, 100 V por 2 horas y revelado con sudan black B (Menéndez, 2002). Las distancias relativas fueron medidas utilizando el programa analizador de imágenes ImageJ V. 1.34S del *National Institutes of Health-NIH*. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la movilidad electroforética.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las especies evaluadas se encontró que *C. officinalis* es la más efectiva para inhibir el daño oxidativo en la apolipoproteína B y que no existen diferencias apreciables en la actividad biológica y el perfil cromatográfico de extractos preparados con material vegetal de *C. officinalis* y *C. scolymus* de distinta procedencia, sin embargo se aprecian diferencias en la capacidad para inhibir oxidación de LDL en extractos de *P. mollisima* obtenidos de material vegetal recolectado en campo y adquirido en casas comercializadoras locales, siendo mas activo el material obtenido en campo (tabla 1).

Tabla 1. Inhibición de la oxidación de Liproteínas de Baja Densidad. Los cambios en la electronegatividad de la ApoB fueron medidos por electroforesis en geles de agarosa 0,8%, buffer barbital 0,05 M, pH 8,6, revelados con sudan black B. Los resultados se muestran como porcentaje de inhibición en la Migración Electroforética Relativa (MER)

	Distancia relativa	% Inhibición MER
LDL Nativa	0,00	100,00
LDL + Cu^{2+}	189,95	0,00
LDL + Cu^{2+} + <i>P. mollisima</i> *	115,88	38,99
LDL + Cu^{2+} + <i>P. mollisima</i> **	78,77	58,53
LDL + Cu^{2+} + <i>C. officinalis</i> *	63,65	66,49
LDL + Cu^{2+} + <i>C. officinalis</i> **	59,86	68,49
LDL + Cu^{2+} + <i>C. scolymus</i> *	79,13	58,34
LDL + Cu^{2+} + <i>C. scolymus</i> **	80,75	57,49

* Material procedente de casas comercializadoras locales

** Material recolectado en campo

Adicionalmente se utilizó el *Plant Drugs Analisis* como una herramienta importante, no solo para el control de calidad de materias primas, sino tam-

bién para la identificación de marcadores en plantas conocidas y la posible relación de ellos con alguna actividad biológica. Así se encontró que es

posible asignar la actividad captadora de radicales libres a determinadas zonas o bandas de la placa cromatográfica, de tal manera que puede presu-

mirse los compuestos de mayor actividad antiradicalaria por comparación con estándares adecuados (tabla 2).

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para el perfil y marcadores característicos de los extractos evaluados

Especie	<i>Calendula officinalis</i>		<i>Passiflora mollissima</i>	<i>Cynara scolymus</i>	
Sistema eluente	AE:AF:AA:A (100:11:11:26)	C:AA:M:A (60:32:12:8)	AE:AF:AA:A (100:11:11:26)	AE:AF:AA:A (100:11:11:26)	C:AC (60:20)
Revelador	NP/PEG	NP/NPG, Anisaldehído	NP/NPG	NP/NPG	Anisaldehído
Marcadores	* quercetina, * rutina, narcissina	* ácido clorogénico, saponinas	* isoorientina, * vitexina, isovitexina	* ácido clorogénico, * cynarina, * luteolina 7-o-glicosido	cynaropicrina

AE: Acetato de Etilo; AF: Ácido Fórmico; AA: Ácido Acético; A: Agua; C: Cloroformo; M: Metanol; AC: Acetona
NP/PEG: Natural Products Reagent em PolietilenGlicol

* Indica zonas positivas para actividad captadora de radicales libres

Por lo tanto, es probable que los compuestos que mayor aportan a la actividad antiradicalaria en *C. officinalis* sean quercetina, rutina y ácido clorogénico; en *P. mollissima* sean isoorientina y vitexina; y en *C. scolymus* correspondan a cynarina, ácido clorogénico y luteolin-7-O-glicósido. Sin embargo

es necesario adelantar estudios posteriores de aislamiento y caracterización que confirmen la presencia y determinen la cantidad de estos metabolitos en cada uno de los extractos, con el fin de establecer una relación cuantitativa entre contenido de antioxidantes e inhibición de oxidación de LDL.

REFERENCIAS

- Brand W, Cuvelier ME, Berset C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.*, 28:25-30.
- Hamilton CA.** 1997. Low-Density Lipoprotein and Oxidised Low-Density Lipoprotein: Their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol Ther.*, 74:55-72.
- Hessler JR, Robertson AL Jr, Chisolm G M.** 1979. LDL induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis*, 32:213-229.
- Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM.** 1983. Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis*, 3:215-222.
- Menéndez RM, Amor AM, Ledón N, Pérez J, González RM, Rodeiro I, Zayas M, Jiménez S.** 2002. Inhibition of rat lipoprotein lipid peroxidation by the oral administration of D003, a mixture of very long-chain saturated fatty acids. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 80:13-21.
- Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM.** 1983. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res*, 24:1070-1076.
- Tyler V.** 1999. Phytomedicines: back to the future. *Journal of the Natural Products*, 62:1589-1592.
- Wagner H, Bladt S.** 2001. *Plant Drugs Analysis*. 2ª ed. Ed . Springer. New York.
- Wilson T, Marcha H, Banzb WJ, Yuqing H, Adlerc S, Meyersd CY, TWintersb TA, Mahera MA.** 2002. Antioxidant effects of phyto- and synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro. *Life Sciences*, 70:2287-2297.
- WHO (World Health Organization).** 2002. Quantifying selected major risks to health. Chapter four. *En: WHO (ed.). The World Health Report - Reducing Risks, Promoting Healthy Life National*. Genova, Italia.