

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD SCAVENGER FRENTE A LOS RADICALES SUPERÓXIDO, PEROXILO E HIDROXILO POR PARTE DE ALGUNOS COMPUESTOS OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES COLOMBIANAS

Constanza Peña B. \*, Luis Fernando Ospina G. \*\*, Jairo Calle A. \*\*, Roberto Pinzón S. \*\*

\* Universidad Nacional de Colombia Facultad de Odontología AA 14490

\*\* Departamento de Farmacia Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia, E-mail ropinzon @ ciencias.ciencias.unal.edu.co

### RESUMEN

Se realizó un estudio para evaluar la posible actividad "scavenger" de 6 compuestos provenientes de plantas medicinales colombianas frente a los radicales superóxido, peroxilo e hidroxilo, mediante el uso de técnicas generadoras y atraparoras de especies de oxígeno reactivas.

Se comprobó la actividad antirradicalaria de la umbeliferona y la hesperidina, la mejor captación de radical peroxilo por khellina, escopolina y umbeliferona. La arbutina y el pinitol mostraron los mejores resultados frente al radical hidroxilo. Cinco de los seis compuestos mostraron resultados promisorios frente al radical superóxido.

**Palabras Clave:** Plantas medicinales - Antioxidantes - Especies de oxígeno reactivas- Radicales superóxido, peroxilo e hidroxilo - Scavenger.

### SUMMARY

To contribute to study the biological activity of six purified compounds of colombian medicinal plants a study was performed to determine its "scavenger" activity. Use up to date methodologies the activity for superoxide, peroxide and hydroxyl radicals was measured for generation and scavenging of ROS.

Umbelliferon and hesperidine confirmed its antiradical activity and the best peroxide radical scavenging corresponded to the khellin, scopolin and umbelliferon compounds. Promising results for the hydroxyl radical scavenging were demonstrated by pinitol and arbutin. Superoxide radical "scavenger" activity was observed in 5 out of the 6 compounds.

**Key Words:** Medicinal plants - Antioxidants - Reactive oxygen species - Superoxide - Peroxide and hydroxyl radicals-Scavenger.

### INTRODUCCIÓN

Las plantas se utilizan desde la antigüedad como fitomedicamentos para el tratamiento de diferentes patologías, pero de la gran mayoría de estas plantas se desconocen sus principios activos y menos aún se ha caracterizado su perfil farmacológico-toxicológico. Se hace entonces necesario determinar la eficacia e inocuidad de estas preparaciones tendiente a validar los usos etnomédicos reportados (1).

Se sabe que las especies de oxígeno reactivas (EOR) cumplen un papel fisiológico, pero si los sistemas antioxidantes no son suficientes para hacer frente a estas especies se genera el "estrés oxidativo", situación que está asociada con más de 50 patologías como cáncer, aterosclerosis, diabetes, envejecimiento, enfermedades que cursan con procesos inflamatorios crónicos, entre otras (2,3).

En esta investigación se abordó el estudio de la actividad antirradicalaria de 6 compuestos aislados de 5 plantas utilizadas en la medicina tradicional colombiana. Los aspectos fitofarmacológicos más relevantes de estas plantas provenientes de la literatura científica se resumen a continuación.

De la hesperidina, se caracterizaron en ratas sus efectos farmacológicos de tipo analgésico, antiinflamatorio, hipolipemiente, antihipertensivo y diurético (4). En nuestro medio la *Baccharis tricuneata* es utilizada para el tratamiento de enfermedades estomacales, dermatológicas y como cicatrizante de heridas (5). De las hojas de esta planta se aisló el compuesto escopolina en una proporción del 0.98 % (6).

Las hojas de *Gliricidia sepium* han mostrado actividad contra cepas de *Neisseria gonorrhoea* (7), antiparasitaria contra *Plasmodium berghei* (8) y actividad insecticida contra *Tribolium confusum* (9). Por otra parte, el pinitol aislado de esta planta (10) ha demostrado tener actividad hipoglucemiante en un estudio con ratones (11). La *Amni visnaga* es utilizada para desórdenes vas-

Recibido para evaluación: 27 de marzo de 1998

Aprobado para publicación 21 de abril de 1998

culares como la angina de pecho por sus efectos vasodilatadores (12); también se le ha descrito actividad contra bacterias grampositivas y algunas especies de *Candida* (13). La arbutina, presente en la *Salvia rubescens*, inhibe la producción de melanina en cultivos de melanocitos humanos, lo que apoya su uso en el vitiligo y otras afecciones cutáneas de este tipo (14,15).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiales

En la Figura 1 se relacionan los compuestos utilizados y las plantas de donde se obtuvieron. El pinitol se obtuvo del extracto etanólico de las hojas desengrasadas de *Gliricidia sepium* Steud, aislado y caracterizado por métodos espectroscópicos (10). La kellina se obtuvo en proporción del 1% de la *Amni visnaga* (16), la escopolina de las hojas de *Baccharis tricuneata* de las cercanías de Santafé de Bogotá (6). La hesperidina, la umbeliferona y la arbutina fueron aisladas por J. Calle A. y col. en los laboratorios de fitoquímica del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Los compuestos fueron disueltos así: patrones, pinitol y arbutina en tampón fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - KOH, 50mM (pH 7.4); umbeliferona y escopolina en EtOH -  $\text{H}_2\text{O}$  (50 : 50); kellina y hesperidina en MeOH -  $\text{H}_2\text{O}$  (50 : 50). Para las pruebas de actividad antirradicalaria se emplearon reactivos de la casa SIGMA: SOD, n-propilgalato, hipoxantina, NBT, xantina oxidasa, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, *Micrococcus lysodeikticus*, TBA, TCA, DMSO, desoxirribosa; de la casa Merck : lisozima, EDTA,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sales para tampón fosfato; el {2,2- Azo-bis-(2-amidinopropano)} (ABAP) fué donado gentilmente por M.J. Alcaraz de la Universidad de Valencia, España.

Las absorbancias y las cinéticas de las técnicas de radicales libres fueron determinadas en un espectrofotómetro UV/VIS UNICAM UV 2-100.

### Captación del Radical Superóxido (17,18,19)

El radical superóxido se generó por el sistema xantina/xantina oxidasa, incubando (concentración final entre paréntesis) SOD (25U/mL), n-propilgalato (100uM), compuestos de ensayo (100uM), EDTA.  $\text{Na}_2$ .  $2\text{H}_2\text{O}$  (1mM), hipoxantina (100uM), NBT(100uM) y tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH, 50mM, (pH 7.4). Luego se adicionó xantina oxidasa (0.066U/mL). La reducción del colorante NBT se determinó midiendo la absorbancia a 560 nm, cada 20 segundos durante 2 minutos. Para descartar

una posible inhibición de la xantina oxidasa se determinó la formación de ácido úrico a 295 nm en presencia de los supuestos captadores.

### Captación de Radical Peroxilo (17,18,19)

Este radical se generó por el sistema ABAP/ lisozima, incubando en baño a 45 °C durante 90 minutos los siguientes reactivos: compuestos de ensayo (100uM), ascorbato (100uM), lisozima (50.000 U/mL), ABAP (50mM) y tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - KOH, 50mM (pH 7.4). Posteriormente se colocaron en baño de hielo y se tomaron 50uL de esta mezcla de reacción y se le adicionaron 950 uL de suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (0.3mg/mL) disueltos en tampón Dulbecco. La inhibición de la actividad de la lisozima se determinó midiendo la absorbancia a 450 nm cada 10 segundos por 30 segundos.

Paralelamente se realizó un experimento control para probar que las muestras de ensayo no alteraran la actividad de la lisozima.

### Captación del Radical Hidroxilo (17,19,20)

Este radical se generó por el sistema  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{3+}$  - EDTA/ Ascorbato, incubando en baño a 37°C por 60 minutos las muestras de estudio(100uM), DMSO (20uM), desoxirribosa(2.8mM), ascorbato(50uM),  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA (20uM-100uM),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.42mM) y tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -KOH, 10mM (pH 7.4), luego se adicionó TCA (1mL) al 2.8% y TBA (1mL) al 1%. Posteriormente los tubos con los reactivos y las muestras de estudio se calentaron a 100°C por 15 minutos y luego se enfriaron en baño de hielo por 5 minutos. La captación del radical hidroxilo se determinó por la formación de un cromóforo a 532 nm. Paralelamente se realizó un experimento control en ausencia de ascorbato para detectar un posible efecto prooxidante de las muestras de ensayo.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se sometieron a "t" de Student unilateral con una probabilidad de error del 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Radical Superóxido

Los datos obtenidos se expresan como % de Inhibición del NBT. Todos los compuestos inhibieron la XO entre el 12% y el 43%. El menor daño lo produjo la umbeliferona y el mayor grado de alteración lo ocasionó la escopolina. Los compuestos que mostraron mayor actividad captadora de este radical fueron la hesperidina

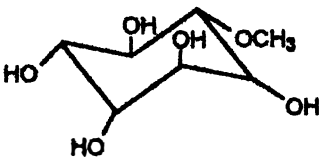
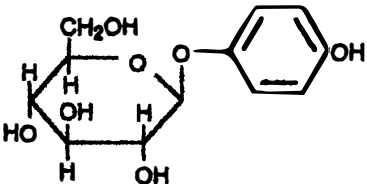
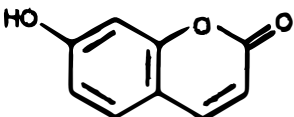
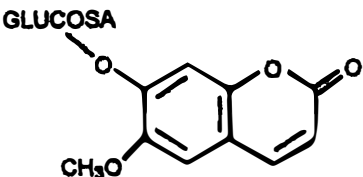
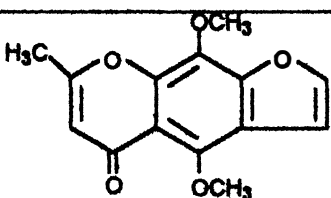
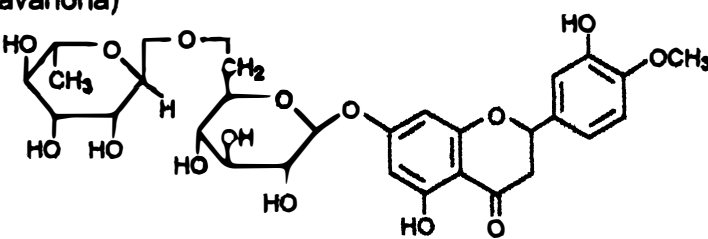
SUSTANCIA (Familia química)	ESTRUCTURA QUÍMICA	PLANTA (Familia)
<b>PINITOL</b> (Inositol)		<i>Gliricidia sepium</i> (Leguminosae)  Hojas "mata-ratón"
<b>ARBUTINA</b> (Glucósido de hidroquinona)		<i>Salvia rubescens</i> (Labiatae)  Hojas "salvia colombiana"
<b>UMBELIFERONA</b> (Coumarina)		<i>Baccharis tricuneata</i> (Asteraceae)  Hojas "chilca o sanalotodo"
<b>ESCOPOLINA</b> (Coumarina)		<i>Baccharis tricuneata</i> (Asteraceae)  Hojas "chilca o sanalotodo"
<b>KHELLINA</b> (Cromeno)		<i>Amni visnaga</i> (Umbeliferae)  Semillas "visnaga"
<b>HESPERIDINA</b> (o-Glucósido de Flavanona)		<i>Citrus sinensis</i> (Rutaceae)  Corteza del fruto "naranja dulce"

Figura 1. Algunos datos básicos de los compuestos estudiados.

y la umbeliferona, pero resultados cercanos se obtuvieron en forma descendente con arbutina, khellina y escopolina. El pinitol reflejó una pobre actividad captadora de este radical.

### Radical Peroxilo

Los resultados se expresan como % de inhibición de actividad de la lisozima. Ni los compuestos ni los vehículos en que fueron disueltos afectaron la actividad lítica de la lisozima sobre los *Micrococcus lysodeikticus*, excepto con escopolina que mostró una actividad lítica adicional del 14%. Los compuestos que resultaron más activos para proteger la lisozima frente al radical peroxilo fueron la escopolina, la khellina y la umbeliferona, con resultados moderados para el pinitol y resultados de menor magnitud para la arbutina y la hesperidina. Todos estos resultados

corresponden al pinitol y a la arbutina. En el experimento control sin ascorbato se demostró que los compuestos no son prooxidantes.

### Discusión Global

Los dos ensayos que hacen más comparables los resultados por no tener interferencia de los solventes son los de los radicales superóxido y peroxilo, presentando el desempeño en forma descendente de la siguiente forma: umbeliferona, khellina, escopolina, hesperidina, arbutina y pinitol. Frente al radical hidroxilo la única observación válida que se pudo realizar fue para la arbutina y el pinitol debido a la interferencia de los solventes. Frente al radical superóxido el pinitol mostró una muy baja actividad frente a los demás compuestos, pero sí mostró una actividad significativa frente al radical peroxilo (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de Actividad Antirradicalaria

COMPUESTOS Concentración Final (cf)		RADICAL SUPERÓXIDO Inhibición NBT %	RADICAL PEROXILO Inhibición de lisozima %	RADICAL HIDROXILO Captación Radical Hidroxilo %
		*1	2*	1*
SOD	25U/mL	64.0 ± 2.3		
n-Propilgalato	100uM	62.4 ± 4.4		
Ascorbato	100uM		10.2 ± 9.4	
α- tocoferol	100uM		4.6 ± 5.0	
DMSO	20uM			94.2 ± 0.6 *
Pinitol	100uM	9.3 ± 0.5 *	30.9 ± 9.1	36.0 ± 11.7 *
Arbutina	100uM	44.3 ± 11.3 *	58.7 ± 10.9 *	43.3 ± 2.8 *
Umbeliferona	100uM	48.4 ± 4.5 *	17.3 ± 1.6	88.4 ± 1.2 *
Escopolina	100uM	39.4 ± 2.6 *	19.6 ± 11.3	79.2 ± 2.1 *
Khellina	100uM	41.7 ± 3.3 *	17.7 ± 1.9	83.0 ± 2.1 *
Hesperidina	100uM	51.7 ± 0.4 *	32.3 ± 6.9 *	40.4 ± 3.8 *

\*1 p < 0.05 respecto al control

\*2 p < 0.05 respecto al patrón ascorbato

fueron comparables al efecto protector logrado con el ácido ascórbico. En este ensayo no hubo evidencia de captación de radical peroxilo por el etanol y el metanol (cf < 1%) aunque la literatura así lo reporta.

### Radical Hidroxilo

La actividad de los compuestos frente al radical hidroxilo se expresa como % de captación de radical hidroxilo. Se utilizó como patrón de referencia el DMSO. El metanol y el etanol presentaron un efecto captador mayor del 80%, lo que afectó los resultados de 4 de los 6 compuestos ensayados, así que los datos más nítidos

Dentro de la familia de las cumarinas se sabe que los compuestos más activos como "scavenger" poseen funciones orto-dihidroxilo, potencia que se disminuye al substituir uno de estos hidroxilos. La metilación o la glicosilación en las posiciones 7 y 8 disminuye en forma importante la actividad captadora (3). Con estas consideraciones era de esperarse que en estos ensayos la umbeliferona diera una mayor actividad antirradicalaria respecto a la escopolina pues la primera de estas cumarinas posee por lo menos un OH no substituido en la posición 8. Los resultados para estos dos compuestos concuerdan con esta suposición. La arbutina conserva

un OH fenólico que puede contribuir a su actividad antirradicalaria, la cual puede ser un mecanismo adicional al posible papel como inhibidor de fosfolipasa A<sub>2</sub> (21) que contribuya al efecto antiinflamatorio potencial para este compuesto.

Si bien la gran mayoría de compuestos "scavenger" de origen natural son de tipo fenólico, se encuentran otra serie de antioxidantes como los alcaloides, poliaminas y compuestos "atípicos" oxigenados (22). La sola presencia de OH no contribuye en forma aparente a la capacidad antirradicalaria, si estos no son fenólicos, como parece suceder con el pinitol.

Los resultados de actividad antirradicalaria obtenidos con la khellina orientan en forma positiva sobre la posible utilidad terapéutica asociada con esta actividad "scavenger", sobre la cual no se encontraron reportes en la literatura.

Algunos resultados se constituyen en base racional de usos etnomédicos de ciertas plantas como *Baccharis tricuneata*, la cual se utiliza ampliamente en nuestro país por sus propiedades antiinflamatorias.

### Agradecimientos

Esta investigación se desarrolló bajo el Programa "Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas Medicinales Colombianas", patrocinado por Colciencias-Universidad Nacional de Colombia y el programa de Postgrado en Farmacología. Los autores agradecen sinceramente el apoyo de estas instituciones.

### BIBLIOGRAFÍA

1. N.R. Farnsworth, O. Akerele, A. Bingel, D.D. Soejarto, Z. Guo. Las Plantas Medicinales en la Terapéutica. *Bol. Of Sanit. Panam.* (4), 314, (1989).
2. B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. "Free Radicals in Biology and Medicine", 2 Ed., Clarendon Press-Oxford (1989).
3. H. Sies. *Am. J. Med.*, 91(suppl 3C), 31 (1991).
4. E.M. Galati, A. Trovato, S. Kirjavainen, A.M. Forestieri, A. Rossitto, M.I. Monforte. *Farmaco* 51(3), 219. (1996). Vía MEDLINE®; Biblioteca Central, U.N. Santafé de Bogotá.
5. H. García-Barriga. Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Vol III. Instituto de Ciencias Naturales. U.N. Santafé de Bogotá. (1974).
6. A.J. Rivera, J. Calle A, J.G. Luis, P. Joseph-Nathan. *Fitoterapia* 65 (3), 285 (1994).
7. A. Cáceres, H. Menendez, E. Méndez, E. Cohobon, B. Samayoa, E. Jáuregui, E. Peralto, G. Carrillo. *Journal of Ethnopharmacology* 48 (2), 85-88 (1996).
8. O. Castro, M. Barrios Chinchilla, M. Guerrero. *Revista de Biología Tropical*, 44 (2part A), 361 (1977).
9. L.A.D. Williams, A. Mansingh. *Insect Science and its Application*, 14(5-6), 697-700 (1993).
10. J. Calle, A. Rivera, P. Joseph-Nathan. *Planta Medica*, 3, 303, (1987).
11. S.S. Handa, A.S. Chawla Maninder. *Fitoterapia*, 60 (3), 195 (1989).
12. J. Durate, I. Vallejo, F. Pérez-Vizcaíno, R. Jiménez, A. Zarzuelo, T. Tamargo. *Planta Medica*, 63 (3), 233 (1997). Vía MEDLINE® 10/97 Biblioteca Central, U.N. Santafé de Bogotá.
13. A.M. Jawad, H.J. Jaffer, A. Al-Naib, A. Naji. *Int. J. Crude. Drug. Res.*, 26(Dec.), 185-188 (1988). Vía IPA 1970-9/96 Biblioteca Central U. N.
14. M. Funayama, H. Arakawa, R. Yamamoto, T. Nishino, T. Shin, S. Murae. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59 (1), 143 (1995). Vía Biological Abstracts, SIDES, Santafé de Bogotá.
15. K. Maeda, M. Fukud. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276(2), 765 (1996). Vía Biological Abstracts, SIDES, Santafé de Bogotá.
16. L. Arteaga de García, J. Calle, P. Joseph-Nathan. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 17 : 931 (1989).
17. M. Payá, B. Halliwell. J.R.S. Hoult. *Biochemical Pharmacology*, 44(2), 205, (1992).
18. M.C. Terencio, M.C. Montesinos M. Radicales Libres. Curso Internacional "Técnicas de Estudio de Fármacos Activos a Nivel de Inflamación y Otros Procesos Mediados por Radicales Libres". Universidad de Valencia, España. (1993).
19. L. F. Ospina. Comprobación de la Actividad Hipoglicémica y Captadora de Radicales Libres Oxigenados de los Principios Activos de *Curatella americana*. Tesis de Post-Grado. Facultad de Ciencias. Maestría en Farmacología. Universidad Nacional de Colombia (1995).
20. M. Payá, B. Halliwell, J.R.S. Hoult. *Free Rad Res Comms* 17(5), 293 (1992).
21. A. E. Oliver, L.M. Crowe, P.S. de Araujo, E. Fisk, H.J. Crowe. *Biochemica et Biophysica Acta* 1302 (1), 69 (1966). Vía Biological Abstract. SIDES, Santafé de Bogotá.
22. R.A. Larson. *Phytochemistry*, 27(4), 969(1988).