

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA EN EXTRACTOS DE ALGUNAS PLANTAS MELASTOMATACEAS

RESUMEN

A catorce especies de la familia melastomataceae, se les realizó una extracción en fase sólida con *i*-PrOH:Agua a diferentes proporciones (30:70, 1:1, 70:30). Para evaluar el comportamiento de las fracciones frente a XO se hizo necesario estandarizar un método de cuantificación de ácido úrico indirecto, acoplando éste con uricasa para obtener un cromógeno de color violeta (555nm). Al evaluar la fracción F1 se observó que las especies *Miconia coronata* Bonpl., *Tibouchina ciliaris* Vent y *Tococa guianensis* Aubl presentaban mayor actividad inhibitoria frente a XO. En la fracción F2, los mas significativos fueron la *Miconia coronata* Bonpl y *Tibouchina ciliaris* Vent.

PALABRAS CLAVES: Actividad antioxidante, Xantina Oxidasa, uricasa, Melastomataceae.

ABSTRACT

Plant material from fourteen species belonging to the melastomataceae family were submitted to solid phase extraction with *i*-PrOH-water at different proportions (30:70, 1:1, 70:30) to evaluate their xanthine oxidase (XO) inhibitory activity. An indirect method to quantify uric acid by coupling with uricase was standardized. In fraction F1, the species with the highest XO inhibitory activity were *Miconia coronata* Bonpl., *Tibouchina ciliaris* Vent and *Tococa guianensis*. For fraction F2, the best inhibitory activity was observed for the species *Miconia coronata* Bonpl and *Tibouchina ciliaris* Vent.

KEYWORDS: Antioxidant activity, Xanthine Oxidase, uricase, Melastomataceae

JOSÉ HIPÓLITO ISAZA M.*

Doctor en Ciencias- Química
jhim@utp.edu.co

ANDREA GARCÍA VIVAS*

Tecnóloga Química
andreae.gv@hotmail.com

ANDREA LONDOÑO M.*

Tecnóloga Química
anjholoma@hotmail.com

FRANCISCO J. JIMÉNEZ G.*

Químico industrial.

JUAN CARLOS SEPÚLVEDA*

Doctor en Ciencias Biomédicas
jcsepulv@utp.edu.co

LUZ ANGELA VELOZA C.*

Doctora en Ciencias Química
lveloza@utp.edu.co

LUZ STELLA RAMIREZ A.*

Doctora en Biología Experimental
luramire@utp.edu.co

* **Grupo Polifenoles UTP-CENIVAM, UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA**

1. INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados con Xantina Oxidasa (XO), enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina y xantina a ácido úrico; muestran que ésta, al ser inhibida, disminuye la acumulación de ácido úrico en las articulaciones, controlando la enfermedad denominada gota. Actualmente se trata la enfermedad con el fármaco alopurinol (análogo de la hipoxantina); el cuál cuando reacciona con XO produce aloxantina, más soluble y de fácil excreción. El uso continuado del alopurinol conlleva a que se presenten efectos contraproducentes para la salud, ya que éste controla, mas no elimina la superproducción de ácido úrico [1]; haciendo necesario encontrar nuevas alternativas para el control y prevención de la gota.

En estudios recientes, se ha demostrado que los compuestos de tipo flavonoide, inhiben la XO [2]; por tal motivo se estudiaron 14 especies de la familia *melastomataceae*, las cuales presentan compuestos de tipo flavonoide y polifenólico, objeto de estudio del grupo Polifenoles UTP.

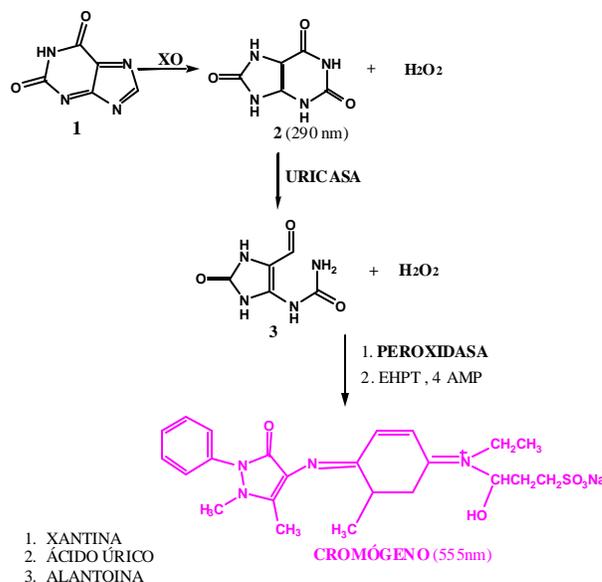


Figura 1. Reacción Cruzada

La determinación de la actividad inhibitoria de XO se realiza, comúnmente determinando la producción de

ácido úrico a 290 nm. Dada la complejidad de los extractos usados en este estudio, es necesario el acoplamiento de la enzima uricasa para producir el producto coloreado como se ilustra en la figura 1, para eliminar las interferencias por matriz. En esta investigación se estandarizó una nueva técnica para la determinación de actividad inhibitorio de XO en extractos vegetales y se ensayó con un grupo de especies de la familia melastomatácea.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Las hojas de las plantas *Miconia prasina* (Sw.) DC, *Miconia elata* (Sw.) DC, *Miconia dolychorrhyncha* Naud, *Miconia trinervia* (Sw) y *Tibouchina minutiflora* Cogn, fueron colectadas e identificadas por la Dra. Luz Mila Quiñones de la Universidad de los Llanos Orientales (Villavicencio); la especie *Tibouchina ciliaris* (Vent.) Cogn, fue colectada por José H. Isaza M. en la vía Armenia e identificadas por los Drs. Frank Almeda de la Academia de Ciencias de California y Susanne Renner del Jardín Botánico de Missouri; y las especies *Miconia coronata* (Bonpl) DC., *Miconia aeruginosa* Naud fueron colectadas por José H. Isaza M. en la vereda La Bananera a orillas del río Otún e identificadas por el Dr. Carlos Parra del Herbario Nacional de Colombia. Las especies *Bellucia pentamera* Naudin, *Bellucia grossularioides* (L.) Triana, *Tococa guianensis* Aubl., *Aciotis purpurascens* (Aubl.) Triana fueron colectadas por Robert Tulio (Fundacofam-Cenivam) en la vereda Bavaria vía Cumaral (Villavicencio) e identificadas por la Dra. Luz Mila Quiñones; la especie *Henrictella Trachyphylla* Triana fue colectada en el vereda Laguneta, vía Pereira-Armenia, identificada por el Dr. Frank Almeda de la Academia de Ciencias de California; la especie *Tibouchina multiflora* (Gardn.) Cogn. se recolectó en la zona urbana del municipio de Pereira (Risaralda) por José H. Isaza M. y fue identificada por la Dra. Susanne Renner del Jardín Botánico de Missouri. Se estudió además una especie no identificada, recolectada por José H. Isaza M en Piangua Grande (Buenaventura). Las hojas de las plantas fueron secadas al ambiente por quince días en el laboratorio de fitoquímica, se molieron en el molino de aspas (MF 10 basic IKA Werke Lab. Calidad de Productos Naturales).

2.2. Reactivos

Para la extracción en cartuchos RP-18 (Merck) se utilizó isopropanol grado analítico. En los ensayos de actividad inhibitoria se emplearon Xantina Oxidasa (Sigma), Xantina (Sigma), Alopurinol (Sigma), Reactivo ácido úrico (uricasa, peroxidasa, EHSPT) (Sera-Pak Plus), Buffer Fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$) y NaCl.

2.3. Extracción del material vegetal

De cada planta se tomaron (por triplicado) 100 mg de hojas secas y molidas, los cuales fueron depositados directamente en un cartucho RP-18 sin acondicionamiento previo. A cada cartucho con su material respectivo, se le adicionó la mezcla *i*-propanol-agua en proporciones (70:30, **F1**), (1:1, **F2**) y (30:70, **F3**).

2.4. Determinación de la actividad inhibitoria de Xantina Oxidasa

Para realizar dicho estudio, se hizo necesario estandarizar cada reacción de manera independiente, siguiendo las especificaciones del fabricante, razón por la cuál se dividió el trabajo en tres partes. En la primera se estandarizó la reacción entre la xantina y la xantina oxidasa, la segunda consistió en la determinación del ácido úrico con la uricasa obteniendo el complejo coloreado, y la tercera consistió en el acoplamiento de la primera y segunda reacciones en una sola celda. En cada estandarización se optimizaron las variables concentración del sustrato, concentración de la enzima, pH y temperatura.

2.5. Determinación de IC_{50} del alopurinol

En la determinación del IC_{50} se realizaron tres ensayos, en donde se varió la concentración inicial de alopurinol desde 100 ppm hasta 500 ppm, midiendo la actividad enzimática.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Estandarización del método

En la optimización de la primera reacción se variaron las concentraciones de xantina y XO en la reacción, observándose la mejor curva cinética y la mejor producción de ácido úrico cuando se emplearon 7.5 mM de xantina y 0.08 U/mL de XO como concentraciones finales en la celda donde se realizó la reacción (Figura 2).

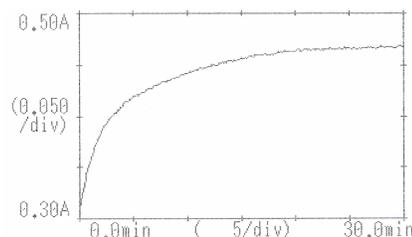


Figura 2. Curva cinética de la primera reacción

Al realizar la segunda reacción se siguieron las indicaciones sugeridas por la casa comercial Sera-Pak Plus, comprobándose la absorbancia del cromógeno (555 nm) y su estabilidad a través del tiempo.

El alopurinol, se empleó como control positivo en los ensayos realizados con los diferentes extractos. Se evaluó el comportamiento del extracto en la segunda reacción dada la complejidad del reactivo ácido úrico (uricasa – peroxidasa), indicando que el extracto no interfiere en la formación del cromógeno en el ensayo de inhibición de XO.

Para realizar la reacción en una sola celda; se incrementó la cantidad de ácido úrico generado en la primera reacción variando la concentración de xantina, dejando constantes las demás variables, obteniendo así las mejores condiciones de reacción, las cuales se muestran en la Tabla 1.

Reactivos	Prueba (mL)	Blanco (mL)
Xantina 150 µM (Concentración final: 27,5 µM)	0,55	---
Xantina oxidasa 0,3 U/mL (Concentración final: 0,08 U/mL)	0,8	0,8
Reactivo ácido úrico	1,25	1,25
Buffer fosfato pH 7	0,4	0,95

Tabla 1. Especificación final de reactivos de ambas reacciones acopladas en una celda

Se procedió entonces a medir un extracto para observar el comportamiento del mismo. Se realizó una curva cinética, la cual mostró un comportamiento irregular, debido a interferencias del isopropanol con la primera reacción, afectando la actividad de la XO. Para evitar dicha interferencia, se secaron los extractos con nitrógeno gaseoso y se redisolviaron en agua destilada. Se determinó que el mejor blanco de reacción es el buffer fosfato dado que no interfiere con las mediciones.

3.2. Optimización de ambas reacciones en una celda con los diferentes extractos

Al realizar los ensayos con los diferentes extractos, se presentaron inconvenientes debido a la gran variación entre las actividades de una misma fracción y de los controles, encontrándose que la temperatura era la responsable de tal variabilidad, dado que los valores de actividad variaban si el ensayo se realizaba en la mañana o en la tarde. Se acopló entonces al espectrofotómetro un sistema térmico con aire caliente para mantener constante la temperatura de la reacción a 33 °C (Fig. 3).



Figura 3. Espectrofotómetro acoplado con control de temperatura

3.3. Validación de la Técnica espectrofotométrica

Para obtener los porcentajes de inhibición de las diferentes especies y validar la técnica se realizaron seis ensayos con controles (positivo y negativo) a diferentes horas y diferentes días (Tabla 2). Los resultados de las actividades enzimáticas, fueron reemplazados en la siguiente fórmula para hallar el porcentaje de inhibición [3]. % Inhibición = $\{1 - (B/A)\} * 100$, donde B= Actividad del control positivo de inhibición (Alopurinol o Extracto) y A= Actividad del control negativo de inhibición.

	A	B	% de Inhibición
Replica 1	2,17	1,02	52,85
Replica 2	2,11	1,05	50,13
Replica 3	2,13	1,07	49,80
Replica 4	1,95	0,99	49,15
Replica 5	2,07	1,03	50,24
Replica 6	1,90	0,85	55,44
Promedio	2,05	1,00	51,27
Desviación	0,11	0,08	2,40

Tabla 2. Validación de Controles. A = Actividad del control negativo de inhibición, B= Actividad del control positivo de inhibición (Alopurinol o Extracto).

3.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la XO de algunos extractos de la familia melastomataceae

Para facilitar el trabajo de laboratorio y el análisis de resultados, se enumeraron las especies, como lo indica la tabla 4.

Número	Especie
1	<i>Miconia coronata</i>
2	<i>Miconia elata</i>
3	<i>Miconia trinervia</i>
4	<i>Miconia prasina</i>
5	<i>Miconia aeruginosa</i>
6	<i>Miconia minutiflora</i>
7	<i>Miconia dolychorrhyncha</i>
8	<i>Tibouchina multiflora</i>
9	<i>Tibouchina ciliaris</i>
10	<i>Henrictella Trachyphyla</i>
11	<i>Tococa guianensis</i>
12	<i>Bellucia grossularioides</i>
13	<i>Aciotis purpuracens</i>
14	<i>Bellucia pentamera</i>

Tabla 4. Enumeración de especies

3.4.1. Porcentajes de rendimiento

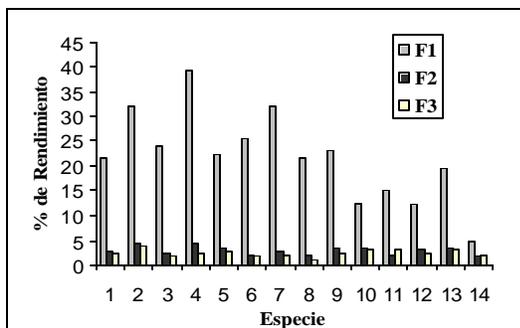


Figura 4. Porcentajes de Rendimiento F1, F2 y F3

Después de obtener las tres fracciones para cada una de las catorce especies estudiadas, se determinó el porcentaje de rendimiento de cada una, por diferencia de pesos. Se realizaron tres replicas (R1, R2, R3) por cada planta. De los porcentajes de rendimiento se puede deducir que a medida que disminuye la polaridad de las fracciones disminuye el porcentaje de rendimiento, excepto para la especie 14 *B. pentamera*. En todos los casos, la fracción 1, la más polar, mostró los mejores rendimientos.

3.4.2. Porcentajes de Inhibición

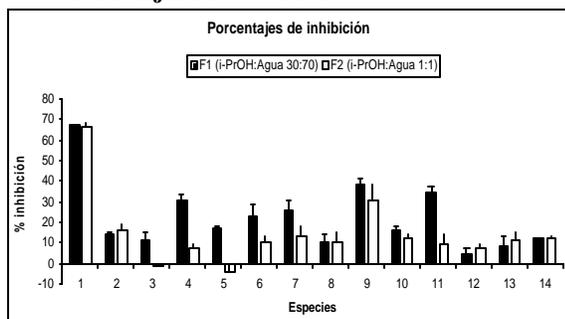


Figura 5. Porcentajes de inhibición en F1 y F2

Para tener datos confiables se utilizó el contraste de Grubbs como herramienta estadística para eliminar datos anómalos. Al comparar los porcentajes de inhibición en ambas fracciones, se puede observar que en general, la fracción F1 muestra mayor inhibición. Además como se puede ver en la figura 5 las especies que presentan mayor inhibición tanto en F1 como F2 son *Miconia coronata* y *Tibouchina ciliaris*. En la F1, los mayores porcentajes de inhibición (>30%) se observaron con *Miconia coronata*, *Tibouchina ciliaris*, *Tococa guianensis* y *Miconia prasina*. Para la F2, los mayores porcentajes de inhibición (>30%) se observaron con *Miconia coronata* y *Tibouchina ciliaris*. En ésta misma fracción las especies *Miconia trinervia* y *Miconia aeruginosa* potenciaron la producción de ácido úrico dando como resultado porcentajes de inhibición negativos.

Como especies promisorias para posteriores estudios fitoquímicos bio guiados, se escogieron aquellas cuyos

porcentajes de inhibición frente a la xantina oxidasa fueron los mas altos, tales como *Miconia coronata* (F1 y F2), *Tococa guianensis* (F1) y *Tibouchina ciliaris* (F1 y F2), a pesar de no presentar altos porcentajes de rendimiento.

Para identificar los responsables de la inhibición, se corrieron las fracciones de interés por HPLC, arrojando cromatogramas con picos definidos. En las fracciones de *Miconia coronata* (F1 y F2), se observó un pico mayoritario con un tiempo de retención de 26,15 min, el cual se identificó por métodos espectroscópicos como *kamferol-7-O-4a,β-ramnosido*, un nuevo flavonoide glicosilado. Lo anterior permite suponer que éste compuesto es el responsable de la inhibición de la XO en las fracciones mencionadas. Sin embargo, para tener certeza de su actividad inhibitoria, es necesario evaluar el compuesto puro por la técnica estandarizada anteriormente.

En los cromatogramas de las especies *Tococa guianensis* y *Tibouchina ciliaris*, se evidencia un pico correspondiente al ácido elálgico [4] y varios compuestos de tipo flavonoide. Para determinar cual de los compuestos presentes en las fracciones de ésta plantas son responsables de su actividad inhibitoria, se hace necesario realizar una separación completa de los mismos, para evaluar el comportamiento de cada compuesto de manera independiente.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La técnica estandarizada en este estudio, por acoplamiento de las reacciones de Xantina Oxidasa con el Kit de para determinación de ácido úrico con uricasa y peroxidasa, mostró ser reproducible y aplicable en estudios de matrices complejas como los extractos vegetales, en la búsqueda de metabolitos con actividad antioxidante.

Las especies con mayor actividad inhibitoria sobre XO fueron *Miconia coronata* Bonpl., *Tibouchina ciliaris* Vent y *Tococa guianensis* Aubl.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Albert L. Lehninger. 1983 Bioquímica de Lehninger. Ediciones Omega, S.A Segunda Edición, 189-254.
- [2] Nagao, A, Seki, M, Kobayashi, H (1999) Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Biosci. Biotechnol Biochem.* 63 (10), 1787-90.
- [3] Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S. (2004) Xanthine Oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biol. Pharm Bull* 27(9) 1414-21.
- [4] Colorado A, Maya DC. (2006) Flavonoides del extracto isopropanol agua (65:35) de *Tibouchina ciliaris* (melastomataceae). Tesis. pp 80-4, Universidad Tecnológica de Pereira.