

Comparación de la actividad anti-inflamatoria de los polifenoles presentes en las frutas; Mora (*Rubus fruticosus* B.), Fresa (*Fragaria vesca* L.) y Grapefruit (*Citrus paradisi* M.)

LILIANA ARAUJO, DIOLIMAR BUITRAGO, MARÍA A. MARQUINA, NORA MORALES, GRECIA MÉNDEZ, TIBISAY PERNÍA, MIRIAM SOSA.

Grupo de Investigación en Cultivos Celulares, Laboratorio de Bioquímica.
Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes. Apartado postal 5101. Mérida, Venezuela.
Liliana@ula.ve, diolbui@ing.ula.ve, gmendez@ula.ve.

RESUMEN

La actividad antiinflamatoria de muchas plantas se ha relacionado con la propiedad antioxidante de sus polifenoles. Con el objeto de determinar la actividad antiinflamatoria de los polifenoles presentes en la mora (*Rubus fruticosus* B.), la fresa (*Fragaria vesca* L.) y el grapefruit (*Citrus paradisi* M.), se aplicaron técnicas cromatográficas utilizando silicagel como adsorbente para separar estos compuestos de los extractos acuosos de cada una de las frutas. Las fracciones fueron reconocidas por cromatografía de papel. La actividad antiinflamatoria de las fracciones fue evaluada por la inhibición de la enzima hialuronidasa y comparada con la aspirina, la cual es una droga antiinflamatoria de naturaleza no esteroidea que inhibe la actividad de la hialuronidasa, enzima involucrada en procesos inflamatorios. Se encontró que todas las fracciones de la mora, el extracto crudo y dos fracciones de la fresa (F1 y F5) y tres del grapefruit (G1, G3 y G5) mostraron un efecto inhibitorio sobre la enzima. Las fracciones M2 y M6 de la mora y las dos de la fresa inhibieron la hialuronidasa en un porcentaje superior o igual al de la aspirina. Los extractos crudos de la mora y del grapefruit no afectaron la actividad de la hialuronidasa.

ABSTRACT

The anti-inflammatory activity of many plants is related to the antioxidant property of their polyphenols. In order to determine anti-inflammatory activity from polyphenols in blackberry (*Rubus fruticosus* B.), strawberry (*Fragaria vesca* L.) and grapefruit (*Citrus paradisi* M.), chromatographic separation in silica gel column of aqueous extractions of the fruits was done. The fractions were labelled using paper chromatography. The anti-inflammatory activity was evaluated by the inhibition of hyaluronidase enzyme

and was compared with aspirin, which is a non-steroidal anti-inflammatory drug that inhibits the enzyme. The hyaluronidase is related to the inflammatory process. We found that all the fractions from blackberry, the crude extract and two fractions of the strawberry (F1 and F5) and three from grapefruit (G1, G3 and G5), showed an inhibitory effect on the enzyme. The fractions M2 and M6 from blackberry and the two from strawberry, inhibit the enzyme hyaluronidase in a higher or similar percentage of inhibition of aspirin. The crudes extracts from blackberry and grapefruit does not show inhibition at all.

PALABRAS CLAVE

Mora (*Rubus fruticosus* B.), fresa (*Fragaria vesca* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* M.), actividad antiinflamatoria, polifenoles.

AGRADECIMIENTO

El desarrollo de esta investigación ha sido posible gracias al apoyo financiero otorgado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT), Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela, con la aprobación de los proyectos: S-FA-11-01, S-FA-10-01 y S-FA-12-01.

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se escogieron las frutas de las plantas: mora (*Rubus fruticosus* B.), fresa (*Fragaria vesca* L.) y grapefruit (*Citrus paradisi* M.) para estudiar la posible inhibición de la enzima hialuronidasa por sus polifenoles, basados en que tales frutas son fuentes abundantes de estos metabolitos secundarios (Albornoz, 1997). Los polifenoles, constituidos por un amplio grupo de compuestos químicos, son investigados actualmente por atribuírseles una variada

actividad farmacológica, en general, asociada a la capacidad de actuar como agentes antioxidantes y barredores de radicales libres (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). A estos antioxidantes naturales, especialmente los flavonoides, flavonoles, flavonones, catequinas, antocianinas y poliflavonoides que son polifenoles, se les reporta como responsables de los siguientes efectos biológicos: antibacterial, antiviral, antiinflamatorio y vasodilatador (Cook y Samman, 1996; Thinquino, 1993 y Lewis, 1989).

La mora (*Rubus fruticosus* B.) y la fresa (*Fragaria vesca* L.) son plantas pertenecientes a la familia *Rosaceae*, cuyos frutos son bayas rojas y comestibles que contienen polifenoles (Otaiza, 1997 y Albornoz, 1997), en una proporción relativamente elevada (Pilando *et al.*, 1985 y Herrmann, 1989). A la mora se le ha atribuido actividad como laxante, vitaminizante, protectora de los vasos sanguíneos y antiinflamatoria, sus hojas tienen propiedad astringente y se utilizan para combatir las diarreas (Thinquino, 1993). Wang y Lin (2000) reportaron la actividad antioxidante en la mora. La fresa por otra parte ha sido utilizada también por su efecto antiinflamatorio, además, de diurético, estimulante estomacal, astringente, antioxidante, e importante para la función del cerebro (Fount, 1962). En cuanto al grapefruit (*Citrus paradisi* M.), de la familia *Rutaceae*, se ha reportado que posee actividad bactericida, fungicida y virucida. Contiene naringenina, principalmente bajo su forma glucosilada (León, 1974) la cual inhibe las enzimas citocromo P450 (Uwe y Anja, 1995). Según Harich (1995) los ingredientes activos del extracto son la combinación natural de bioflavonoides y ácido ascórbico, efectivos contra varios microorganismos patógenos como bacterias, hongos y una gama de virus incluyendo: el del polio, herpes, hepatitis y HIV. El grapefruit, inhibe la proliferación *in vitro* de las células cancerígenas de mamas en humanos (So *et al.*, 1996).

Como se desprende de la revisión anterior la presencia de polifenoles unida a su capacidad antioxidante definen sus actividades farmacológicas, debido a la disponibilidad de hidrógeno fenólico, como donador de hidrógeno y barredor de radicales libres. En un estudio *in vitro* reportado utilizando el conjugado hialuronato-manganeso, se encontró que el radical libre, el anión superóxido, es contundentemente eliminado, demostrando actividad antiinflamatoria. Esta actividad resultó ser superior a la de la enzima superóxido dismutasa, también barredora de radicales libres en forma de superóxido. La superóxido dismutasa suprime el edema inducido por la inyección subcutánea de carragenina en las patas de ratones de experimentación (Sakurai *et al.*, 1997). La inducción de edema, es un modelo muy utilizado para detectar el efecto antiinflamatorio de compuestos químicos de naturaleza variada (Winter *et al.*, 1962), pero implica el sacrificio de animales de experimentación. La inhibición de la enzima hialuronidasa es también un método para

detectar actividad antiinflamatoria, es confiable y preciso, menos costoso y libre de crueldad. De manera que, en la medida que la enzima hialuronidasa sea inhibida por el compuesto polifenólico en estudio, proveniente de las frutas escogidas, mayor será su actividad antiinflamatoria, y esta actividad inhibitoria posiblemente sea debida a la capacidad de los polifenoles de actuar como barredores de los radicales libres que se forman como consecuencia de un proceso inflamatorio.

Las drogas antiinflamatorias de naturaleza no esteroidea, como la aspirina y la indometacina, inhiben la actividad de la enzima hialuronidasa, la cual es una de las enzimas lisosomales que hidroliza los mucopolisacáridos incluyendo el ácido hialurónico, que es un agente protector y de unión del tejido conectivo. Esta enzima es conocida por estar involucrada en procesos inflamatorios y de permeabilidad vascular, y su inhibición está correlacionada con polifenoles con actividad antiinflamatoria (Lee *et al.*, 1993). Por su capacidad de afectar la permeabilidad de las membranas tisulares, la presencia de la enzima también guarda relación con la invasión bacteriana y la fertilización. (Gennaro, 1998).

Gracias a que la fresa, la mora y el grapefruit, son plantas fácilmente identificables por las características externas, podemos recurrir a ellas para prevenir enfermedades y mejorar nuestra calidad de vida, ya que son de fácil manejo y de uso popular (Albornoz, 1997). Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, nos planteamos en esta investigación comparar la actividad inhibitoria de la enzima hialuronidasa por los polifenoles presentes en estas frutas con la acción que ejerce la aspirina sobre la misma, con el fin de encontrar cual de ellas o de sus correspondientes fracciones, tiene la actividad esperada, representando así un paliativo natural contra los problemas de salud que derivan del proceso complejo y molesto de la inflamación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de extractos y separación por cromatografía de columna

500 g de cada uno de los frutos se licuaron con 100 ml de metanol y se filtraron a través de una gasa. Los filtrados metanólicos (extractos crudos) se pasaron por una columna de gel de sílice (medium mesh, Merck) equilibrada con metanol y luego eluida con una mezcla de polaridad creciente de metanol-agua y las fracciones obtenidas se concentraron a presión reducida en un rota vapor a 45°C.

Cromatografía de papel y medida del pH

Las diferentes fracciones fueron identificadas utilizando cromatografía de papel para obtener el registro de valores Rf en dos solventes diferentes: butanol-ácido acético-agua (BAW) en proporción de

4:1:5 y ácido acético y agua al 6%, como revelador se usó el cloruro férrico al 2% en metanol (Schomburgk, 1998). La identificación de los Rf y la medición del pH se realizó con el fin de localizar en las diferentes fracciones de las frutas, constituyentes con una similitud en el recorrido y en el valor de pH. Tales parámetros permitieron la posibilidad de correlacionar las fracciones entre sí.

Prueba de detección de polifenoles con cloruro férrico

Se mezcló una gota de cloruro férrico diluido al 2% en metanol con una gota de cada una de las fracciones obtenidas. La positividad de la prueba se puso de manifiesto con la aparición de una coloración que varió de azul a negro.

Inhibición enzimática

Las correspondientes fracciones se rotavaporaron hasta la sequedad, se pesaron y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada. El efecto inhibitorio sobre la actividad de la hialuronidasa se evaluó siguiendo la metodología descrita por Lee *et al.* (1993) para lo cual se utilizó hialuronato de potasio, p-dimetilaminobenzaldehído y la hialuronidasa de Sigma Chemical Co. La actividad de la enzima se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 585 nm. Se midió la cantidad de N-acetilglucosamina producida a partir de hialuronato de potasio. Para activar la hialuronidasa (0,4 unidades) se le añadió CaCl₂ 2,5 mM en buffer de acetato 0,1 M a pH 3,5 y se incubó a 37° C por 20 min. El hialuronato de potasio (0,6 mg) y concentraciones respectivas de las fracciones fueron adicionadas a la hialuronidasa activada, y se incubaron a 37° C por 20 min. El control se preparó agregando buffer acetato en lugar de la fracción. Se empleó 0,1 ml de NaOH 0,4 N y 0,1 ml de borato de potasio 0,4 M para detener la reacción de la enzima, seguido de calentamiento en baño de agua hirviendo por 3 min. Se agregó 3 ml de p-dimetilaminobenzaldehído 67 mM a la mezcla anterior, y se incubó a 37° C por 20 min. El control y las muestras tratadas con las fracciones se midieron a una densidad óptica (OD) de 585 nm. y se compararon con el ácido acetil salicílico (aspirina). La DO_{585} del control fue $0,053 \pm 0,013$. El efecto inhibitorio de las fracciones sobre la actividad de la hialuronidasa se calculó como sigue: % de inhibición = $[(DO_{585} \text{ control} - DO_{585} \text{ muestra}) / DO_{585} \text{ control}] \times 100$. Los resultados fueron el promedio de cinco determinaciones más o menos la desviación estándar y se analizaron por el test de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 1 resume los resultados obtenidos de la extracción de los polifenoles presentes en los extractos acuosos de las frutas; mora (*Rubus fruticosus* B.), fresa (*Fragaria vesca* L.) y grape fruit (*Citrus paradisi* M.), y de la determinación de la actividad inhibitoria de sus fracciones y de la aspirina (patrón de comparación) sobre la enzima hialuronidasa. El porcentaje de inhibición de la aspirina (17%), de los extractos crudos y de las fracciones de cada fruta se aprecia en la figura 1, en la cual se observa que los extractos crudos tanto

de la mora, como el de grapefruit no ejercieron efecto alguno sobre la enzima, en tanto, que el de la fresa mostró 3,70 % de inhibición, siendo este valor inferior al de la aspirina. Todas las fracciones de la mora, dos fracciones de la fresa (F1 y F5) y tres del grapefruit (G1, G3 y G5) mostraron un efecto inhibitorio sobre la enzima; siendo las M2 y M6 de la mora, la F1 y la F5 de la fresa, las que inhibieron a la enzima en un porcentaje superior o igual al de la aspirina (41,5%, 35,9%, 18,9% y 17% respectivamente).

El registro de los valores de Rf y el pH (tabla 1) de los extractos crudos y sus correspondientes fracciones, no se correlacionan con las variaciones del porcentaje de inhibición, esto sugiere que la actividad inhibitoria no depende del pH, ni está relacionada con un compuesto específico común a las tres frutas estudiadas.

La verdadera reacción de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de las frutas podría originar factores que resultarían en la inactivación de la enzima. Estudios realizados por Kaur y Ali (1982) sobre el efecto inhibitorio de la tiosemicarbasona sobre algunas enzimas, incluyendo la hialuronidasa, demuestran una relación definitiva entre la actividad antiinflamatoria y la inhibición de la misma. Así mismo, la acción efectiva de agentes antiinflamatorios no esteroideos como la acemetacina y la indometacina, entre otros, se ha relacionado con la inhibición de la hialuronidasa (Jacobi *et al.*, 1980). Los resultados obtenidos por Hisao *et al.*, (1985) al estudiar el efecto inhibitorio que tienen los taninos sobre la hialuronidasa, sugiere que muchos de esos compuestos posee actividad antiinflamatoria. La eficacia antiinflamatoria de un flavonoide (5,3',4'-trihidroxi-6-metoxi flavona) fue investigada en modelos crónicos y agudos en inflamación de ratas, cuyos resultados revelan el posible uso de este compuesto como agente antiartrítico y antiinflamatorio (Agarwal, 1982).

Debido a la escasez de información acerca del efecto inhibitorio que podrían ejercer las frutas utilizadas en el presente estudio sobre la enzima hialuronidasa, no se puede realizar una comparación con resultados previos. Sin embargo, conociendo la presencia de polifenoles en la fresa, la mora y el grapefruit, podemos hacer referencia a ciertos reportes existentes sobre extractos de otras plantas, como es el caso de la *Echinacea*, utilizada como medicamento fitoterapéutico para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades infecciosas. La *Echinacea* posee innumerables compuestos, entre los cuales se citan los ácidos fenólicos, que actúan como agentes con efectos fisiológicos: antiviral y antiinflamatorio, además, inhibe la hialuronidasa y activa a los fibroblastos (células que desarrollan el tejido conectivo) transformándolas en células que a su vez producen ácido hialurónico (Rininger *et al.*, 2000). Sen y Nag Chaudhuri (1991) al investigar el potencial antiinflamatorio de las fracciones metanólicas de un extracto de *Pluchea indica rotos* encontraron una actividad inhibitoria significativa contra carragenina, histamina, serotonina e hialuronidasa en inflamaciones inducidas. Así mismo en estudios *in vitro* con ratas, se ha reportado que taninos condensables obtenidos por cromatografía de columna de fase reversa a partir de

extractos de las frutas inmaduras de manzana, revelaron que inhibieron fuertemente la liberación de histaminas y la actividad de la enzima hialuronidasa, sugiriendo que estos polifenoles poseen un efecto antiinflamatorio y anti-alérgico (Kanda *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

1. Las fracciones obtenidas del extracto acuoso de la mora, la fresa y el grapefruit tienen acción inhibitoria sobre la enzima hialuronidasa, lo cual sugiere la presencia de compuestos fenólicos con propiedades antiinflamatorias.

2. De los extractos crudos de las tres frutas, sólo el de la fresa exhibió actividad inhibitoria sobre la

hialuronidasa, la cual arrojó un valor de 3,70 %, porcentaje éste inferior al de la aspirina.

3. Al comparar el efecto inhibitorio de la mora, la fresa y grapefruit sobre la enzima, la mora reveló los mejores resultados, siendo dos de sus fracciones las que presentaron mayor porcentaje de inhibición, seguida de la fresa, cuyas fracciones ejercieron un efecto similar o igual al de la aspirina sobre la hialuronidasa, y el grapefruit, considerada la fruta con resultados poco satisfactorios, ya que las fracciones que exhibieron actividad, resultaron tener valores de inhibición por debajo de la aspirina.

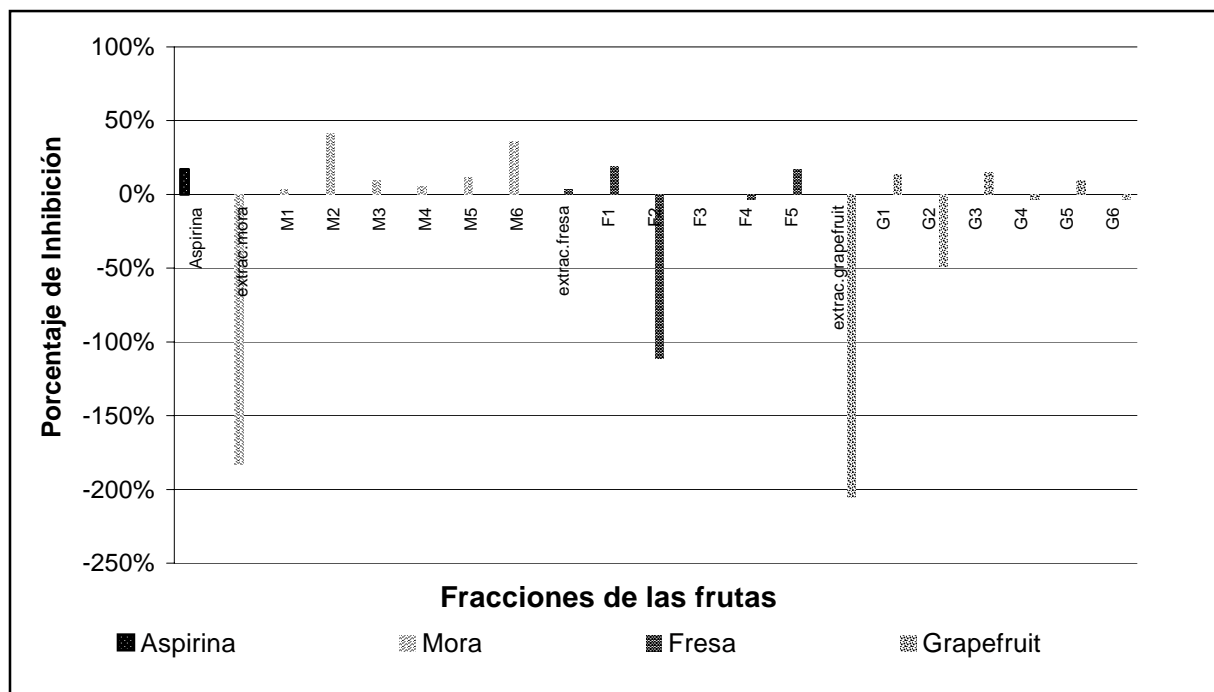
4. El efecto inhibitorio que ejercen las diferentes fracciones sobre la hialuronidasa parece no estar influenciada por el pH.

Tabla 1. Análisis cromatográfico de las fracciones obtenidas en la extracción acuosa de la mora, fresa y grapefruit, prueba de polifenoles, pH y porcentaje de inhibición de la hialuronidasa.

Muestra	Cromatografía de papel (RfX100)				Prueba de polifenoles (FeCl ₃)	pH	% I
	BAW(UV)	Ac-OH6% (UV)	BAW(FeCl ₃)	Ac-OH6% (FeCl ₃)			
Extracto Crudo.Mora			81 69	91 16	+	3.0	-183.1
^a M1			75	91 14	+	4.0	3.7
^a M2			80		+	4.1	41.5
^a M3		80 18		88 16	+	3.1	9.4
^a M4					+	4.6	5.6
^a M5				79 18	+	2.9	11.3
^a M6			81	91 16	+	3.0	35.9
Extracto Crudo.Fresa	21	95			+	9,6	3.7
^b F1	18	92	45	88	+	9,5	18.9
^b F2	16	83			+	9,5	-111.3
^b F3	14	70			+	9,5	0.0
^b F4	10	84			+	3,7	-3.7
^b F5	45	99	86	95	+	9,4	17
Extracto Crudo.Grap	75				+	3,0	-205.6
^c G1	11	25	67	81	+	3,4	13.3
^c G2	11	34	64	83	+	4,1	-49.0
^c G3					+	3,4	15.1
^c G4	19 19 53 93	61 82			+	6,1	-3,7
^c G5	19	99			+	4,6	9,4
^c G6	19 53 96	59 84 91			+	7,0	-3.7
ASA					NP	NP	17.0
Control					NP	NP	0.0

Clave: Fracciones: ^aMora, ^bFresa, ^cGrapefruit; ^dPrueba polifenoles = FeCl₃ 2 %p/v en metanol; %I = porcentaje de inhibición de hialuronidasa; Solventes de corrida = BAW (butanol:ácido acético:agua; 4:1:5), AcOH6% (ácido acético 6 % v/v); Detección = UV (ultravioleta), Spray FeCl₃ (FeCl₃ al 2 % p/v en metanol); ASA = Aspirina; Control = Enzima + Sustrato; NP = no probados.

Figura 1. Inhibición de la enzima hialuronidasa por las fracciones de las frutas: mora, fresa y grapefruit.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, O. P. 1982. **The anti-inflammatory action of nepitrin, a flavonoid.** Agents Actions. 12(3):298-302.

Albornoz., A. 1997. **Medicina Tradicional Herbaria.** Editorial Instituto Farmacoterapeutico Latino S.A. Caracas. Venezuela. P. 429-430.

Cook, N. C. y Samman, S. 1996. **Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.** Nutr. Biochem. 7:66-76.

Fount, Q. 1962. **Plantas Medicinales.** Editorial Labor, Barcelona. España. P. 315-316.

Gennaro, A. 1998. **Rémington Farmacia.** Editorial Médica Panamericana, España, P. 1924.

Harich, J. 1995. **Antimicrobial grapefruit extract.** United States Patent number 5,425,944.

Herrmann, K. 1989. **Occurrence and content of hydroxycinnamates and hydroxybenzoic acid compounds in foods.** CRC Rev. Food Sci. Nutr. 28:315-347.

Hisao, K., Hitoshi, M. y Toshio, S. 1985. **Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80, and inhibitory effect of anti-allergic agents on hy hyaluronidase.** Chem. Pharm. Bull. 33(2):642-646.

Jacobi, H., Breier, P. y Dell, H.D. 1980. **Anti-inflammatory action of acemetacin.** Arzneimittelforschung. 30(8A):1326-47.

Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R., Saito, Y. 1998. **Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells.** Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(7):1284-89.

Kaur, S. y Ali B. 1982. **Effect of anti-inflammatory thiosemicarbazone indoles on hyaluronidase, acid phosphatase and trypsin.** Pharmacology. 24(3):162-8.

Lee, J., Lee, H. S. y Min, R. K. 1993. **Inhibitory effect of hidrolizable tannins on ca⁺² activated hyaluronidase.** Planta Med. 59:381-82.

León, A. 1974. **Flora de Cuba.** Editorial Otto Koeltz. Science Publishers Koenigstein. Tomo 1. P.105.

Lewis, D. A. 1989. **Anti-inflammatory drugs from plant and marine sources. Inflammatory inhibitors.** Verlag 3:47-56.

Martínez-Valverde, I., Periago, M. J. y Ros, G. 2000. **Nutritional importance of phenolic compounds in the diet.** Arch. Latinoam. Nutr. 50(1):5-18.

Otaiza, R. 1997. **Plantas usuales en la medicina popular de Mérida.** Editado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (C.D.C.H.T.) ULA. Mérida. Venezuela. P. 177.

Pilando, L. S., Wrolstad, R. E. y Heatherbell, D. A. 1985. **Influence of fruti composition, maturity, and mold contamination on the color and appearance of strawberry wine.** J. Food Sci. 50:1121-1125.

Rininger, J.A., Kickner, S., Chigurupati, P., McLean, A. y Franck, Z. **Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells.** Journal of Leukocyte Biology. 68 (4): 503-510.

Sakurai, K., Andoh, M., Yamada, M., Kodera, Y., Nishimura, H., Hiroto, M., Matsushima, A., Aoyama, M., Yamamoto, H. y Inada, Y. 1997. **Supresión of ischemic edema in mice by manganese-hyaluronate conjugate.** Jpn. J. Pharmacol. 74(1):117-200.

Schomburgk, S. E. 1998. **Polifenoles en cultivos y su importancia.** Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. P. 96-101.

Sen, T. y Nag Chaudhuri, A. K. 1991. **Antiinflammatory evaluation of a Pluchea indica root extract.** J. Ethnopharmacol. 33(1-2):135-41.

So, F., Guthrie, N., Chambers, A., Moussa, M. y Carroll, K. 1996. **Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices.** Nutr. Cancer. 26(2):167-181.

Thinquino, B. 1993. **Terapias Naturales.** Publicaciones Latinoamericana Rayos de Luz. Colombia P. 330-334.

Uwe, M. D. y Anja L. 1995. **The fate of naringin in humans.** Clin. Pharmacol Ther. 58:365-373.

Wang, S. Y. y Lin, H. S. 2000. **Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage.** J Agric. Food Chem. 48(2):140-46.

Winter, C. A., Risley, E. A. y Russ, G. W. 1962. **Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs.** Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111, 544.