



Evaluación de la actividad anticolagenasa del látex de *Croton lechleri*

Lucio Obando-Barrera¹, César Fuertes Ruiton¹

Información del artículo

Historia del artículo

Recibido: 12/07/2019
 Aprobado: 30/08/2019

Autor corresponsal

Cesar Fuertes Ruiton
 cfuertesr@unmsm.edu.pe

Financiamiento

Autofinanciado

Conflictos de interés

Ninguno

Citar como

Obando-Barrera L, Fuertes Ruiton C. Evaluación de la actividad anticolagenasa del látex de *Croton lechleri*. Rev Peru Med Integrativa.2019;4(4):116-20.

Resumen

Objetivo. Determinar la capacidad inhibitoria del látex de *Croton lechleri* (sangre de grado) frente a la enzima colagenasa, atenuando la formación de arrugas como consecuencia del efecto hidrolítico del colágeno por parte de la enzima. **Materiales y métodos.** Se ha utilizado el método *in vitro* de Thing para probar la actividad anticolagenasa, comparando la actividad del látex con el control positivo conformado por una solución epigallocatequina (EGCG) a concentraciones de 125, 250, 500 1000 ug/mL. **Resultados.** El porcentaje de inhibición de Látex de *Croton lechleri* a concentración de 0 ug/mL es 0; de 125 ug/mL es 5,67; de 250 ug/mL es 17,34, de 500 ug/mL es 33,41 y de 1000 ug/mL es 59,53. **Conclusiones.** El látex de *Croton lechleri* exhibió una actividad anticolagenasa significativa superando al control positivo, mostrando una IC₅₀ de 908,02 y 1892,03 ug/mL respectivamente.

Palabras clave: Colagenasa; Látex; Croton; Inhibición.

Evaluation of the anti-collagenase activity of the latex of *Croton lechleri* latex

Abstract

Objective. Determine the inhibitory capacity of *Croton lechleri* latex (Dragon's Blood) against the collagenase enzyme, reducing wrinkle formation as a consequence of the hydrolytic effect of the collagen by the enzyme. **Materials and methods.** Thing's *in vitro* method has been used to test the anti-collagenase activity, compared the activity of the latex with the positive control formed by an epigallocatechin solution (EGCG) at concentrations of 125, 250, 500 1000 ug/mL. **Results.** The percentage of *Croton lechleri* latex inhibition at a concentration of 0 ug/mL is 0, 125 ug/mL is 5.67, 250 ug/mL is 17.34, 500 ug/mL is 33.41 and 1000 ug / mL is 59.53. **Conclusion.** It has been concluded that *Croton lechleri* latex has exhibited significant anti collagenase activity exceeding the positive control, showing an IC₅₀ of 908.02 and 1892.03 ug/mL respectively.

Keywords: Collagenase; Latex; Croton; Inhibition.

¹ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Introducción

Croton es un género de la familia Euphorbiaceae que rodea las 1300 especies, largamente repartida por todo el mundo. Diversas especies poseen una función muy significativa en el uso habitual de las plantas medicinales en el continente africano, asiático y americano⁽¹⁾. *Croton lechleri* es la especie más usada y estudiada debido a que exuda una cantidad considerable de látex que posee efecto farmacológico y cosmético⁽²⁾.



Figura 1. Látex de *Croton lechleri*⁽²⁾

Esta especie tiene investigaciones a nivel fisicoquímico y microbiológico, las sustancias químicas que posee como flavonoides, terpenos, alcaloides, etc. conservan relación con la aparición de compuestos carcinogénicos⁽³⁾; igualmente, tiene la propiedad de regenerar los tejidos, actividad antioxidante, antiulcerosa, propiedades antidiarreicas, anticancerígenas, antiinflamatorias y antirreumáticas. Además, posee propiedades antisépticas en el ámbito vaginal^(4,5); todo lo mencionado otorga a esta especie vegetal un potencial terapéutico importante.

El envejecimiento es un tema que preocupa a muchos investigadores; algunos ven a la vejez como una evolución por etapas, que se va desarrollando de forma inalterable, propia y natural, que se da en toda especie viviente, vinculando la genética del ser vivo con su entorno ambiental. Eludir la senectud es el mayor anhelo de la humanidad, y tratarla simboliza un reto científico⁽⁶⁾.

La «sangre de grado» es empleada desde épocas ancestrales y sigue siendo utilizada actualmente porque ha demostrado propiedades cicatrizantes, antivirales, antiinflamatorias, anticancerígenas⁽⁷⁾ y, posiblemente, actividad antitumoral⁽⁸⁾. Los metabolitos que posee, como

la taspina, la 4-O-metilcedrusina, la 3-4-O-dimetilcedrusina⁽⁹⁾, el principio SP-303 y la proantocianidina oligomérica^(10, 11), son algunos de los responsables en tratamientos de enfermedades digestivas, afecciones producidas por úlceras gástricas, padecimientos renales y hepáticos⁽¹⁰⁾ y, de forma externa, para enfermedades de la piel como el acné, además de incrementar las defensas del organismo⁽¹²⁾.

En los últimos años el interés por la eliminación de las arrugas o el deterioro del colágeno, ha motivado a la industria cosmética a realizar investigaciones basadas en plantas medicinales que contengan propiedades antioxidantes, anticolagenasa y antielastasa⁽¹³⁾; por consiguiente, la evaluación del látex de *Croton lechleri* pretende probar la actividad anticolagenasa y usarla de manera adecuada, mediante preparados cosméticos como lociones y cremas, y así contribuir con el desarrollo de la industria de ingredientes naturales y de fitocosméticos basados en plantas de la biodiversidad peruana.

Materiales y métodos

Muestra vegetal. Se colectó el látex de *Croton lechleri* «sangre de grado», en el departamento de Loreto, provincia de Maynas, distrito de Amazonas, a una altitud de 102 m de altitud y a 3° 45' de latitud sur. La muestra botánica fue identificada por el biólogo José Campos De La Cruz y transportada por vía aérea, en condiciones adecuadas de refrigeración.

Extracción y conservación del látex

La muestra vegetal fue extraída mediante incisiones a la corteza del árbol de *Croton lechleri*; la cantidad recolectada fue de 250 mL y almacenada entre 2 a 8 °C⁽¹⁴⁾.

Solubilidad y marcha fitoquímica

Se realizaron pruebas de solubilidad en agua, alcohol y propilenglicol, con 1 mL de muestra diluida en 10 a 100 mL de cada solvente. El estudio fitoquímico del látex de *Croton lechleri* mostró la presencia de carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides, aminoácidos, antocianinas y alcoholes ramificados.

Determinación de la inhibición de la enzima colagenasa

Se aplicó la técnica analítica ensayada por Thing⁽¹⁵⁾, la cual consiste en colocar en tubos de ensayo, 100 µL del látex de *Croton lechleri* (a concentraciones de 125; 250; 500 y 1000 µg/mL) con 210 µL de la enzima colagenasa de *Clostridium histolyticum* (solución de 1,54 unidades/mL en buffer tris-glicine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl₂ pH 7,5) e incubar durante 15 min a 37 °C. Luego se agregó 240 µL del sustrato N- [3-(2- furyl) acryloyl]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA, solución de 2,1 mM en buffer tris-glicine 50 mM con 400 mM NaCl y 10 mM CaCl₂ pH 7,5) y se procedió a

incubar durante 5 min a 37 °C para que la reacción se lleve a cabo. Finalmente, se añadió 1-2 gotas de ácido fórmico 10% para detener la reacción y se realizó la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro de luz UV-Visible Thermo Scientific-Genesys 10S, a una longitud de onda de 348 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\% \text{ Actividad anticlagenasa} = (\text{Abs}_c - \text{Abs}_s) \times 100 / \text{Abs}_c$$

Donde:

Abs_c = absorbancia del placebo

Abs_s = absorbancia del compuesto con sustrato – absorbancia del compuesto sin sustrato

Las EC_{50} (concentración efectiva media) se cuantificó por análisis de regresión lineal. La abscisa representa las concentraciones del látex de *Croton lechleri* y la ordenada representa la media del porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa.

Análisis estadístico

Se determinó la diferencia significativa de cada una de las medias obtenidas del porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa del látex de *Croton lechleri*, empleando el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 95 % ($p \leq 0,05$).

Resultados

Solubilidad

Moderadamente soluble en agua.

Soluble en alcohol.

Moderadamente soluble en propilenglicol.

Marcha fitoquímica

Tabla 1. Marcha fitoquímica del látex de *Croton lechleri*

Reacción	Metabolito secundario	Característica positiva	Calificación
Molish	Carbohidratos	Anillo color violeta	++
Fehling	Carbohidratos	Precipitado rojo	+++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	Precipitado verde azulado	+++
Gelatina	Taninos	Precipitado blanquecino	++
Bortranger	Antraquinonas	Coloración rojiza	++
Shinoda	Flavonoides	Coloración diversa (amarillo-naranja)	++
Reacción afrosimétrica	Saponinas	Formación de espuma, mayor a 1 cm, que dura más de 10 min.	+++
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado rojo ladrillo.	+
Mayer	Alcaloides	Precipitado blanquecino	++
Bertrand	Alcaloides	Precipitado grisáceo	+
Ninhidrina	Aminoácidos	Color violáceo.	-
Rosenheim	Antocianinas y Flavonoides catequicos	Coloración rojiza	+
Lieberman	Triterpenoides, esteroides.	Coloración amarillenta	+++
Soneschein	Alcaloides	Precipitado marrón	+

Positivo abundante (+++). Positivo regular (++). Positivo mínimo (+). Negativo (-)

Inhibición de la enzima colagenasa

Tabla 2. Inhibición de la enzima colagenasa del látex de *Croton lechleri*

Látex de <i>Croton lechleri</i> (ug/mL)	Promedio absorbancia* (muestras)	Promedio absorbancia* (Blanco)	Diferencia (Abs. muestra – Abs. blanco)	Porcentaje de inhibición
0	0,817	0	0,817	0
125	0,77166667	0,001	0,77066667	5,671155
250	0,70333333	0,028	0,67533333	17,33986
500	0,692	0,148	0,544	33,41493
1000	0,64366667	0,313	0,33066667	59,52672

Absorbancia: 348 nm IC50 (µg/mL) = 908,02 µg/mL

Análisis estadístico

El porcentaje de inhibición en la columna de la muestra indica diferencia significativa entre las medias usando el método Anova, con un nivel de confianza al 95 % ($p < 0,05$).

Tabla 3. Análisis Anova

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6911,45102	4	1727,86275	8,8973E+14	1,0509E-72	3,478049691
Dentro de los grupos	1,942E-11	10	1,942E-12			
Total	6911,45102	14				

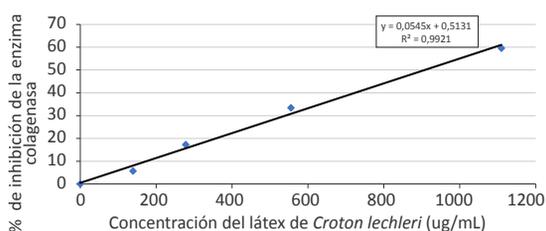


Figura 2. Correlación entre la concentración del látex de *Croton lechleri* vs. porcentaje de inhibición de la enzima colagenasa.

Discusión

Emplear plantas medicinales en el tratamiento de las arrugas, fundamentado en la medicina folclórica, y sin investigaciones etnofarmacológicas, no suele coincidir con el conocimiento de sus propiedades cosméticas y/o farmacológicas; además, sus actividades brindan parámetros que validan su uso como una admisible elección.

El látex de *Croton lechleri* «sangre de grado», que se usa en la Amazonía como cicatrizante para heridas dérmicas, tiene como uno de los principales componentes a la taspina (metabolito localizado en su composición química); no obstante, aún no hay investigaciones de su actividad para inhibir la enzima colagenasa. Cabe destacar que la administración de *Croton lechleri* en ratones no ha generado toxicidad hematológica ni bioquímica^[16].

La actividad anticolagenasa del látex de *Croton lechleri* aparece desde las concentraciones bajas y se va incrementando a mayor concentración. La Tabla 2

muestra valores de inhibición que fluctúan en el rango de 5,67 - 59,53%, con $IC_{50} = 908,02 \mu\text{g/mL}$, que comparado con el $IC_{50} = 1892,03 \mu\text{g/mL}$ del compuesto de referencia demuestran que el extracto posee más del doble de actividad anticolagenasa que el EGCG. El estudio estadístico de Anova evidencia un $p < 0,05$, por lo que los promedios de los porcentajes e inhibición son estadísticamente distintos en cada concentración del látex.

En el estudio se halló que el látex de *Croton lechleri* posee una mayor inhibición de la enzima colagenasa, comparada con la investigación realizada a la *Caesalpinia spinosa*^[17] «tara», exhibe un $IC_{50} = 196,752 \mu\text{g/mL}$ para el extracto de tara, referenciado con el $IC_{50} = 216,991 \mu\text{g/mL}$ del compuesto de EGCG.

Del mismo modo, en la determinación de la actividad anticolagenasa del extracto hidroalcohólico de rizoide, se obtuvo un $IC_{50} = 1350 \mu\text{g/mL}$ para el EGCG y un $IC_{50} = 50001 \mu\text{g/mL}$ que comparado con los resultados del látex de *Croton lechleri*, esta última presenta mayor actividad de inhibición de la enzima colagenasa.

Esto demuestra que el *Croton lechleri* «sangre de grado», es un potente inhibidor de la actividad colagenasa, muchísimo más que la «tara».

Conclusión

El látex de *Croton lechleri* evidenció actividad anticolagenasa *in vitro* (método de Thing). Se obtuvo un $IC_{50} = 908,02 \mu\text{g/mL}$ que representa más del doble de la capacidad inhibitoria de la enzima colagenasa que posee el estándar de referencia EGCG: $IC_{50} = 1892,03 \mu\text{g/mL}$.

Referencias bibliográficas

1. Salatino A, Faria M, Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton species* (Euphorbiaceae). Sociedad Brasileira de Química. 2007; 18(1): 11-33.
2. Risco E, Vila R, Henriques A, Cañigual S. Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de grado. *Revista de Fitoterapia*. 2005; 5(2): 101-14.
3. Sandoval M, Ayala S, Oré R, Loli A, Huamán O, Valdivieso R, Béjar E. Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. *Anales de la Facultad de Medicina—UNMSM*. 2006; 67(003): 199-205.
4. Gupta D, Gupta R, Bleakley B, Dragon's blood: Botany, Chemistry and Therapeutics uses. 2008; 115(3): 361-80
5. Ayala S, Rojas J, Díaz D, Juárez J, Delgado C. Evaluación de la toxicidad vaginal de *Croton lechleri* en conejas. *Anales de la Facultad de Medicina – UNMSM*. 2010; 71(2).83-7.
6. Martínez R, Adolfini M, Hernández M, Encarnación M. Aproximación al tratamiento del envejecimiento cutáneo. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. *Ars Pharm*. 2015; 56(4): 183-91.
7. Puebla P, Guerreo M, Correa S. Flavonoides del Género *Croton*. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas*. 2004; 33(1): 77-85
8. Tirado N, Carvajal R, Romero L. Efectos genotóxicos y antigenotóxicos de la savia de *Croton draconoides*. *Biofarbo* 2000; VIII: 71-6.
9. Pieters L. La "sangre de grado" Una droga tradicional de Sudamérica. Constituyentes biológicamente activos. 1era edición – Quito, 1998.
10. Sandoval M, Ayala S, Oré M, Valdivieso L, Loli R, Ricra V, Huamán O. Evaluación de la toxicidad hepática y renal aguda y subaguda del látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado) en animales de experimentación. *Anales de la Facultad de Medicina – UNMSM*. 2005; 66(002): 119-26.
11. León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Revista Sociedad Química Perú*. 2007; 73(3): 158-65.
12. Reynel C, Pennington T, Pennington D, Flores C, Daza A. Árboles útiles de la Amazonia peruana. 1era edición. Lima—Perú 2003.
13. Muñoz del Olmo J, Serra Renom J. Rejuvenecimiento periorbitario no invasivo. *Cirugía plástica Ibero-Latinoamericana*. 2008; 34(1): 11-8.
14. Cevallos D, Jaramillo C, Cuesta O, García G, Rojas L. Composición química, actividad cicatrizante y toxicidad del látex de *Croton lechleri*. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 2016 XXVI, N.º 2, 95-103
15. Thring TS, Hili P, Naughton DP. Anti-Collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of 21 plants. *BMC Complement Altern Med*. 2009; 9:t 27.
16. Betancur J, Ríos F, Villacrés J, Mendocilla M, Figueroa L, Villar A, Aranda J. Efecto de la administración crónica del látex liofilizado de *Croton lechleri* Muell.Arg. "sangre de grado" en *Rattus norvegicus* var. Albinus. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2017; 2(1):13-20.
17. Nuñez WJ, Quispe R, Ramos N, Castro Aj y Gordillo G. Actividad Antioxidante y Antienzimática in vitro y antiinflamatoria in vitro del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* "tara" *Ciencia e Investigación* 2016, 19(1):35-42