

————— *Artículo original* —————

Farmacología de Terpenoides de *Helianthus annuus* L.

Recibido el 23 de abril de 2007

RODRIGO EUGENIO DÍAZ VICIEDO *

Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

RESUMEN

Desde los albores de la humanidad, las plantas han sido fuente de interés por sus características nutricionales y medicinales. Por ello, se realizó un estudio farmacológico de terpenoides de *Helianthus annuus* L., optimizando un método de extracción, aislamiento y purificación de dichos metabolitos, para evaluar una posible actividad farmacológica sobre modelos de inflamación. También se evaluó una potencial actividad antiinflamatoria utilizando extractos (metanólico y acuoso) de la planta. Se aislaron tres diterpenos, dos kauranos y un traquilobano, mediante técnicas cromatográficas, identificándose sus estructuras por RMN (^1H , ^{13}C) y eva-

* Contacto:

Rodrigo Eugenio Díaz Viciedo.

Avenida Gran Bretaña 1093, Playa Ancha, Valparaíso, Chile.

Teléfono: 32-2508440.

Fax: 32-2508111.

E-mail: rodrigo.diaz@uv.cl

Abreviaturas: ϕ : Diámetro; λ : Longitud de onda; CC: Cromatografía en Columna; COX: Ciclooxigenasa; DMSO: Dimetilsulfóxido; EIA: Enzimoimmunoensayo; ELISA: Enzime-Linked Inmunosorbent Assay; FLA₂: Fosfolipasa A₂; h: Altura; HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución; IFN- γ : Interferón gamma; LPS: Lipopolisacárido bacteriano; LTB₄: Leucotrieno B₄; MPO: Mieloperoxidasa; MTT: Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; NO: Oxido nítrico; NP/PEG: Reactivo Productos Naturales/Poli-etilenglicol; PBS: Tampón fosfato; PGE₂: Prostaglandina E₂; RMN: Resonancia magnética nuclear; TLC: Cromatografía en capa fina; TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa; TPA: 13-Acetato de 12-o-tetradecanoilforbol.

luando su pureza por HPLC. Paralelamente se evaluó la variación estacional del ácido grandiflorólico y de la mezcla de ácido kaurenoico y traquilobánico obtenida, en diferentes sumidades de la planta durante su desarrollo, con el fin de determinar dónde y cuándo se produce una máxima acumulación del metabolito estudiado, para así obtener una extracción con un mayor rendimiento. Se encontraron diferencias significativas útiles para el control de calidad de preparados a base de plantas medicinales que contengan algunos de estos metabolitos secundarios. Para el estudio de la actividad farmacológica de los terpenoides y de los extractos, se trabajó sobre dos modelos de inflamación (*in vivo* e *in vitro*). En el modelo *in vivo* se evaluó la acción de los compuestos sobre el edema producido por aplicación tópica de TPA en oreja de ratón, evaluando en paralelo la infiltración leucocitaria en términos de actividad mieloperoxidasa. En este modelo los ácidos kaurenoico y traquilobánico demostraron actividad antiinflamatoria. En el modelo *in vitro* se utilizaron cultivos celulares de una línea de macrófagos, evaluando la actividad de los compuestos sobre la liberación de mediadores inflamatorios (NO, PGE₂ y TNF- α), y sobre la enzima COX, donde se observó que el ácido grandiflorólico y el extracto metanólico mostraron actividad inhibitora sobre la liberación de estos mediadores, además el ácido grandiflorólico mostró actividad inhibitora de la enzima COX. Sin embargo, no se descarta que en las actividades antiinflamatorias de dichos compuestos estén implicados otros mediadores.

Palabras clave: Productos naturales.—Terpenos.—Macrófagos.—Inflamación.

ABSTRACT

Pharmacology of Terpenoids from *Helianthus annuus* L.

Since the dawn of the humanity plants have been a source of interest because of their nutritional and medicinal characteristics. For that reason, a pharmacologic study of the terpenoids of *Helianthus annuus* L. was done, optimizing a method of extraction, isolation and purification of these metabolites in order to evaluate a possible pharmacologic activity in inflammation models. Also, potential antiinflammatory activity was evaluated using extracts (methanolic and watery) of the plant. Three diterpenes, two kauranes and a trachylobane were isolated, by means of chromatographic techniques; their structures were identified by RMN (¹H, ¹³C) and their purity was evaluated by HPLC. Parallely, the seasonal variation of grandiflorolic acid and kaurenoic and the trachylobanic acid mixture obtained was evaluated, in different above-ground parts from the plant during its development, with the purpose of determining where and when the highest accumulation of the studied metabolite occurs thus to obtain an extraction with the greatest yield. Useful significant differences were found for the quality control of preparations with medicinal plants that contain some of these secondary metabolites. For the study of the pharmacologic activity of the terpenoids and the extracts, two models of inflammation (*in vivo* and *in vitro*) were worked on. In the *in vivo* model, the action of compounds was evaluated on edema produced by

topical application of TPA in mouse ear, evaluating in parallel the leucocitary infiltration in terms of mieloperoxidase activity.

In this model the kaurenoic and trachylobanic acids demonstrated antiinflammatory activity. In the *in vitro* model cellular cultures of a line of macrophages were used, the activity of compounds on the liberation of inflammatory mediators (NO, PGE₂ and TNF- α), and the COX enzyme were evaluated, where it was observed that the grandiflorolic acid and the methanolic extract showed inhibiting activity on the liberation of these mediators. Also, the grandiflorolic acid showed inhibiting activity on the COX enzyme. However, one does not rule out other mediators being implicated in the antiinflammatory activities of these said compounds.

Key words: Natural products.—Terpenes.—Macrophages.—Inflammation.

INTRODUCCIÓN

Ricas en nutrientes, las plantas constituyen una de las principales fuentes de alimento y energía. Desde sus orígenes, el hombre las consume y las cultiva, siendo hoy en día indispensables para su supervivencia. Sin embargo, el ser humano mediante su observación empírica, no solamente aprendió a consumirlas, sino también a utilizarlas para curar sus heridas y sus dolencias. Este hecho, quizá, sería el preámbulo de lo que mucho más tarde, ya en el año 1815, Seydler definiría como Farmacognosia.

La Farmacognosia es la Ciencia Farmacológica que se ocupa del conocimiento de las materias primas de origen biológico que el farmacéutico o la industria farmacéutica emplean para la elaboración de los medicamentos. En los últimos años esta definición ha ido adquiriendo un resurgimiento y una relevancia muy importante dentro del contexto farmacéutico y social. Es clara la tendencia mundial de crecimiento de este mercado, donde las personas se están volcando hacia «lo natural», en el cual no sólo participan los productos fabricados a partir de drogas vegetales y plantas medicinales, sino también los productos homeopáticos.

En este contexto, es imprescindible y fundamental que el crecimiento y desarrollo de los productos naturales venga acompañado y validado por medio de la investigación científica.

Podemos decir que los productos naturales han desempeñado, y desempeñan un papel significativo en la medicina moderna porque nos proporcionan un número elevado de fármacos extremadamente útiles, difíciles en algunos casos de sintetizarlos en el laboratorio. También sirven como prototipos o modelos para fármacos de síntesis con actividad similar al original, más eficaces y menos tóxicos (1).

El Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid ha venido desarrollando hasta ahora diversas investigaciones vinculadas al estudio de los productos naturales, desde su extracción, aislamiento y purificación, hasta su acabado estudio farmacodinámico sobre diferentes modelos (*in vivo* e *in vitro*) y sistemas (Sistema Nervioso Central, Sistema Cardiovascular Periférico, etc.) que conduzcan a descubrir nuevos fármacos con aplicación terapéutica. Por consiguiente, este trabajo pretende seguir con estos mismos cánones, enmarcándose dentro de esta línea de investigación desarrollada hasta el momento.

Para la realización de esta investigación se eligió como sustrato vegetal el girasol (*Helianthus annuus* L.). Trabajos realizados tomando como materia prima las flores y las cabezuelas desprovistas de las semillas, dieron como resultado el aislamiento de diterpenos de tipo kaurano, como los ácidos kaurenico y traquilobánico (2). También se ha descrito la presencia de otro derivado, el ácido grandiflorólico en extractos provenientes de estas sumidades (3).

En los últimos años, se ha evaluado la actividad antiinflamatoria, tanto *in vitro* como *in vivo* de algunos compuestos diterpénicos, de estructura kaurano, como el foliol y el linearol (4) entre otros, encontrándose que estos compuestos inhiben significativamente la liberación de algunos mediadores de la inflamación. Otros diterpenos, del tipo clerodanos, abietanos y rosanos, mostraron una marcada acción sobre la vía de la ciclooxigenasa, que determina la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂). Los abietanos, por su parte, afectaron la producción de óxido nítrico (NO) (5). Otros terpenos de origen marino, como la variabilina y la bolinaquinona, mostraron una marcada inhibición sobre la fosfolipasa A₂ (FLA₂), además de inhibir la síntesis y posterior liberación del leucotrieno B₄ (LTB₄) (6-7).

Como objetivos de este trabajo se propusieron el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de estructura terpénica de

Helianthus annuus L.; la evaluación de la variación estacional de estos metabolitos en los órganos de la planta, con el fin de estudiar la distribución de estos en la especie y finalmente estudiar la actividad farmacológica de estos metabolitos y de los extractos obtenidos a partir de esta especie vegetal.

Como se dijo anteriormente, este trabajo se enmarca dentro de esta línea de investigación, y dado el contenido en compuestos diterpénicos de la especie *Helianthus annuus* L., con este estudio se pretende contribuir al conocimiento fitoquímico y farmacológico de la especie vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal utilizado tanto para el estudio de la variación estacional de los metabolitos, como para el aislamiento de los mismos, fue recolectado en dos periodos de tiempo distintos (3 de septiembre de 2004 y 23 de octubre de 2004), coincidiendo con su periodo de cosecha (septiembre-noviembre). Ambos grupos de muestras se obtuvieron de un mismo lugar geográfico, en Picazo del Júcar (Cuenca), Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha. Este material vegetal se desecó a temperatura ambiente para luego proceder a separar las sumidades de ambos grupos, agrupándolas en tres subgrupos: flores, cabezuelas y hojas. A continuación estos subgrupos se sometieron a molturación.

Procesos de extracción

Los extractos de los distintos subgrupos de estas sumidades aéreas se obtuvieron mediante el proceso de extracción en Soxhlet, utilizando éter de petróleo (punto de ebullición 40-65° C), hasta agotamiento del material vegetal, aproximadamente cinco días. Los extractos resultantes de cada subgrupo se concentraron por separado, mediante destilación a vacío en un rotavapor (R-Büchi), obteniéndose un residuo semisólido amarillo-rojizo con cada uno de ellos. Estos

residuos fueron conservados a una temperatura de 2 a 8° C para su posterior análisis cromatográfico: cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el posterior estudio fitoquímico y farmacológico se obtuvieron un extracto metanólico y un extracto acuoso, ambos de las hojas de *Helianthus annuus* L. mediante extracción Soxhlet.

Procesos de aislamiento y purificación

Del extracto obtenido a partir de 1 kg de cabezuelas sin semillas (44 g) se eliminan los ácidos grasos realizando una saponificación con 27,5 g de KOH, 200 mL de MeOH, 50 mL de benceno y 25 mL de agua, en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas, calentando a reflujo durante dos horas más. El residuo obtenido se diluye en agua hasta 40 mL aproximadamente. Esta solución se neutraliza y acidifica con un exceso de ácido acético glacial hasta alcanzar un $\text{pH} \approx 2$, para posteriormente realizar una extracción con éter etílico en embudo de decantación. Se elimina la fase acuosa. La fase orgánica se lava con agua, se deseca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora a sequedad en rotavapor, obteniéndose un residuo de 39,1 g. Este residuo se trató con 384 mL de MeOH y 118 g de urea durante una hora a reflujo, con el fin de eliminar como clathratos la mayoría de los componentes de cadena lineal (hidrocarburos, alcoholes y ácidos grasos) que interfieren en el proceso de aislamiento. Transcurrido el reflujo, la solución se filtra y el filtrado se evapora a sequedad para luego realizar nuevamente una extracción con éter etílico en las mismas condiciones anteriores. La fase orgánica se lava con agua, se deseca con Na_2SO_4 anhidro y se evapora a sequedad en rotavapor, obteniéndose 21,4 g de un residuo. Este residuo fue cromatografiado en columna de sílica gel 60 (tamaño partícula 0,040-0,063 mm, $h_{\text{columna}} = 34$ cm, $\phi_{\text{columna}} = 6,5$ cm), eluyendo por gradiente fracciones de 200 mL aproximadamente. Se utilizaron los siguientes eluyentes en las proporciones indicadas: hexano, hexano: acetato de etilo 9:1, hexano: acetato de etilo 3:1 y hexano: acetato de etilo 1:1.

Cromatografía en columna con gel de sílice impregnado con AgNO₃

Esta técnica es muy utilizada para separar isómeros moleculares que eluyen juntos por cromatografía ordinaria, y que sólo se diferencian entre sí por el número de insaturaciones presentes en su estructura química. Tanto el ión Ag⁺ como la plata en su estado metálico (Ag⁰) poseen cierta afinidad por los enlaces insaturados en una molécula. La magnitud de la afinidad es proporcional al número de insaturaciones. La metodología fue la misma que se utilizó en la cromatografía en columna, pero en este caso se utiliza sílica gel impregnada con nitrato de plata (AgNO₃). Para este ensayo se utilizó sílica gel 60 con 10% de AgNO₃ (700 g de sílica gel + 70 g de AgNO₃ + 70 mL agua) ($h_{\text{columna}} = 26 \text{ cm}$, $\phi_{\text{columna}} = 6 \text{ cm}$). Como eluyente se utilizó una mezcla de hexano: acetato de etilo 88:12, en elución isocrática, eluyendo fracciones de 100 mL aproximadamente.

Identificación estructural de los compuestos obtenidos

Se llevó a cabo mediante técnicas de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en un espectrómetro Avance Bruker de 250 MHz, utilizando CDCl₃ como solvente y tetrametilsilano como patrón de referencia. Se realizaron espectros ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT-125 y HSQC con el fin de identificar la naturaleza estructural de los carbonos.

Cromatografía en capa fina (TLC)

Esta técnica fue aplicada tanto a los extractos obtenidos como a los productos eluidos en las cromatografías en columnas, que permite visualizar de forma preliminar la composición de dichos extractos y la pureza de los compuestos eluidos, respectivamente. Estas cromatografías se realizaron sobre cromatofolios con soporte de aluminio de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) con indicador de fluorescencia al UV, utilizando como fases móviles una mezcla de hexano: acetato de etilo 1:1 (para los extractos etéreos), tolueno: cloroformo: etanol 40:40:10 (para el extracto metanólico y los productos eluidos en CC)

y acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua 100:11:11:26 (para los extractos metanólico y acuoso). Como reactivo de revelado se utilizaron la vainillina sulfúrica —solución A: vainillina al 1% en etanol (10 mL), solución B: H₂SO₄ al 5% en etanol (5 mL)— y el NP/PEG (Natural Products Poliethilenglycol reagent) (solución A: ácido β-etilamino éster difenilbórico al 1% en metanol (10 mL), solución B: PEG-4000 al 5% en etanol (8 mL), emisión de fluorescencia a una λ de 365 nm).

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Esta técnica se utilizó para cuantificar los metabolitos aislados de la CC en los extractos obtenidos para poder establecer e investigar la variación estacional de los mismos. Además, esta técnica nos facilitó información sobre la composición y la pureza de los extractos y de los metabolitos aislados, respectivamente, estudio que se llevó a cabo por HPLC en fase reversa. Antes de proceder a su inyección, los extractos se prepararon siguiendo una modificación del protocolo descrito por Kubo (8). Una cantidad conocida (10-30 mg) del extracto etéreo obtenido se disolvió en metanol (3 mL), esta solución se pasó a través de una pequeña columna (diámetro interno 0,5 mm) compactada con Silicagel 0,040-0,063 mm (Merck) (0,5 cm), carbón (Merck) (0,2 cm) y Silicagel (0,5 cm), respectivamente. Una vez realizada esta operación, se procedió a lavar esta columna con metanol (2 mL), sumando este volumen a los 3 mL anteriormente obtenidos. Esta solución metanólica fue la que se inyectó en el equipo de HPLC. Como patrón externo (curva estándar) se utilizó una solución madre de 10 mg/mL de los productos obtenidos en la CC. Se utilizó un cromatógrafo modular, modelo Varian Mos. 2510, equipado con detector UV *diode array* y con una columna Tracer Excel 120 ODS B 5 μm, 25 × 0,46. Como fase móvil se utilizó metanol HPLC en elución isocrática con un flujo de 1 mL/min a 40° C.

Edema inducido por TPA en oreja de ratón

Se siguió la técnica descrita previamente por Recio y cols. (9). El proceso inflamatorio se inició mediante la aplicación de 10 μL del

éster de forbol TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) (Sigma) (2,5 µg/oreja) disuelto en acetona, en cada superficie (interna y externa) de la oreja derecha de todos los ratones Swiss machos (25 ± 3 g), agrupados en lotes de seis animales. Simultáneamente, se aplicó en la misma oreja el producto de referencia (indometacina) (0,25, 0,5 y 1,0 mg/oreja) o el compuesto problema (0,25, 0,5 y 1,0 mg/oreja), utilizando como vehículo acetona. Se aplicó el mismo volumen del vehículo (acetona) en la oreja izquierda (control). A las cuatro horas se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical para obtener a continuación, mediante un sacabocados, secciones de 6 mm de diámetro de la porción central de las orejas. El edema producido en cada ratón se midió mediante la diferencia de peso entre la oreja tratada y la oreja control. Estas muestras fueron utilizadas a continuación para la determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa.

Determinación de la actividad mieloperoxidasa

La actividad de esta enzima, contenida en los lisosomas de neutrófilos, es un indicador de la presencia de estos leucocitos en los exudados inflamatorios, por lo que su determinación a partir de las secciones de oreja obtenidas en el ensayo anterior, indica el grado de infiltración de neutrófilos que ha tenido lugar durante el desarrollo del ensayo. Después de homogenizar las secciones de las orejas (40 segundos) en 1,5 mL de suero fisiológico, se centrifugaron a 10.000 g durante 15 minutos a 4° C. La actividad mieloperoxidasa se midió en los sobrenadantes según el método descrito por Gil y cols. (10). La reacción se realizó en placas de 96 pocillos, y para ello se añadió a 50 µL de sobrenadante, 150 µL de tampón fosfato PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM), 15 µL de NaH₂PO₄ (0,22 M, pH 5,4), 20 µL de H₂O₂ (0,034%) y 20 µL de tetrametilbencidina (Sigma) (18 mM en dimetilformamida al 8%). Después de una incubación de tres minutos a 37° C, se detuvo la reacción con 30 µL de tampón acetato sódico (1,46 M, pH 3,0) midiéndose las absorbancias (densidades ópticas) a 630 nm en un lector de placas (Digiscan mod. 6010152EU, Asys Hitech). Los resultados se expresan como absorbancias a esta longitud de onda, del lote control y de los diferentes lotes problema.

Materiales de cultivo celular

El cultivo de la línea de macrófagos de ratón RAW 264.7 utilizados para los siguientes experimentos se realizó en un incubador a 37° C en atmósfera humidificada con un 95% de aire y un 5% de CO₂ en placas Petri estériles de 10 mL (Sarstedt). El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (Cf = 2 mM), suero bovino fetal (Cf = 10%), penicilina-estreptomocina (Cf = 2%), gentamicina (Cf = 0,4%) y L-arginina (Cf = 1 mM). Todos los productos señalados anteriormente son de Gibco, con excepción de la L-arginina (Sigma).

Estudio de la toxicidad celular

Una vez obtenidos los macrófagos mediante rascado de una placa Petri y posterior centrifugación (800 g, 5 min, t^a ambiente), se realizó el recuento de los mismos y se resuspendieron en medio de cultivo a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/mL. Se distribuyeron alícuotas de 200 µL en placas estériles de 96 pocillos (Sarstedt), y se incubaron durante dos horas para permitir su adherencia al fondo de la placa, tras lo cual se reemplazó el medio con el fin de eliminar las células no adheridas. Las células se trataron con los compuestos objeto de estudio a distintas concentraciones (concentración final de DMSO < 0,001%) durante un periodo de incubación de 24 horas. A continuación, se determinó la viabilidad de estas células, para estudiar el posible efecto tóxico del compuesto, mediante la cuantificación de la respiración mitocondrial a través de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) a formazán, siguiendo el método descrito por Scudiero (11). Para ello, se sustrajeron 100 µL del medio de cultivo de cada pocillo, adicionando a continuación 20 µL de MTT estéril (2 mg/mL en tampón PBS). Tras incubar una hora a 37° C se eliminó el medio y se añadieron 100 µL de DMSO a cada pocillo, para solubilizar los cristales de formazán formados. La formación de formazán se determinó espectrofotométricamente a 550 nm en un lector de placas (Digiscan mod. 6010152EU, Asys Hitech). Los resultados se expresan como % de viabilidad respecto a las células sin tratar, que representan el 100% de viabilidad (12).

Generación de óxido nítrico (NO)

Se prepararon los macrófagos en las mismas condiciones que el ensayo anterior, distribuyéndose alícuotas de 200 μL ($0,5 \times 10^6$ células/mL) en placas estériles de 96 pocillos. Después de incubar durante 24 horas se reemplazó el medio con el fin de eliminar las células no adheridas y se añadieron los compuestos problema, incubando las células durante 30 minutos. A continuación se procedió a estimular a los macrófagos, añadiendo una mezcla del lipopolisacárido LPS [*Salmonella typhimurium* (Sigma), 0,5 $\mu\text{g/mL}$] e IFN- γ [murino, (Genzyme), 20 U/mL], continuando la incubación durante 17-20 horas. La concentración de NO liberado al medio se midió determinando la presencia de nitritos con el reactivo de Griess (13). Se prepararon alícuotas de 100 μL de los medios de cultivo en placas de 96 pocillos, a las que se añadieron 100 μL de reactivo de Griess [1% de sulfanilamida (Sigma), 5% de H_3PO_4 y 0,1% de N-[1-naftil]etilendiamina (Sigma) en agua destilada]. La absorbancia del cromóforo resultante se midió en un espectrofotómetro de placas a 540 nm. Las concentraciones de nitritos en las muestras se calcularon mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar de NaNO_2 .

Generación de TNF- α

Se procedió al cultivo de los macrófagos de la misma manera anterior, pero en este caso se utilizaron placas de 24 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Siguiendo el mismo procedimiento ya descrito para el pretratamiento con el compuesto problema y la estimulación con LPS/IFN- γ , se procedió a la determinación de los niveles del TNF- α en los sobrenadantes, basado en una fase sólida ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) siguiendo las instrucciones y recomendaciones indicadas por el proveedor (Amersham Biosciences). Como inhibidor de referencia se utilizó dexametasona (1 μM).

Generación de PGE₂

Se cultivaron macrófagos de la misma manera anterior, en placas de 24 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/mL). Después de incubar por un periodo de 18 horas aproximadamente, se procedió a reponer el medio de cultivo, se pretrató con los compuestos en estudio y finalmente se estimuló con LPS/IFN- γ . Después de 16 horas de incubación, se recogen los sobrenadantes y se procede a medir los niveles de PGE₂ utilizando para ello el kit comercial Prostaglandin E₂ Bio-trak Enzymeimmunoassay (EIA) System, siguiendo las instrucciones y recomendaciones indicadas por el proveedor (Amersham Biosciences). Cabe destacar que los niveles totales de PGE₂ cuantificados en este experimento son el producto de la actividad conjunta de la COX-1 y de la COX-2.

Ciclooxigenasa-1 (COX-1)

Los macrófagos (10^6 células/mL) fueron sonicados a 4° C en un ultrasonicador a máxima potencia. Los microsomas fueron preparados por centrifugación (2.000 g, 5 min., 4° C), seguido de una ultracentrifugación del sobrenadante (100.000 g, 100 min., 4° C) (6). Los microsomas obtenidos (20 μ g/tubo) se preincubaban durante 15 minutos en 50 mM de tampón Tris-HCl, pH 7,4, con hematina (2 μ M), L-triptófano (1 mM) y con los compuestos problema. Transcurrido este tiempo, se adiciona ácido araquidónico (100 μ M) y se incuba a 37° C durante 30 minutos. La reacción se detiene por calentamiento a 90° C durante cinco minutos. Los niveles de PGE₂ fueron determinados por EIA.

Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

Los macrófagos (10^6 células/mL) fueron resuspendidos en medio de cultivo RPMI 1640 con aspirina (300 μ M) e incubados a 37° C durante dos horas. Se realizó un lavado dos veces, para luego resuspenderlas en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino e incubadas con LPS/IFN- γ a 37° C durante 24 horas. Después de una centrifugación (800 g, 5 min., 4° C) las células fueron sonicadas a

4° C en un ultrasonificador a máxima potencia, y los microsomas fueron preparados como se describió anteriormente. Los microsomas (40 µg/tubo) fueron usados como fuente de COX-2, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente (6). Los niveles de PGE₂ fueron determinados por EIA.

RESULTADOS

El extracto obtenido de las cabezuelas sin semillas de *H. annuus* L. con éter de petróleo fue sujeto a los procesos de extracción, aislamiento, purificación y caracterización anteriormente descritos, obteniéndose los siguientes derivados terpenoides, ácido traquilobánico (ácido *ent*-traquiloban-19-oico) (**1**), ácido kaurenoico (ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico) (**2a**) y ácido grandiflorólico (ácido *ent*-15β-hidroxi-kaur-16-en-19-oico) (**2b**) (Figura 1), todos ellos con una alta pureza.

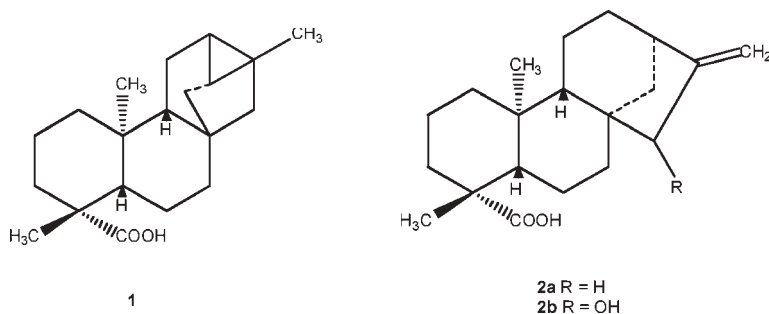


FIGURA 1. **Estructuras de los diterpenos:** ácido traquilobánico (ácido *ent*-traquiloban-19-oico) (**1**), ácido kaurenoico (ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico) (**2a**) y ácido grandiflorólico (ácido *ent*-15β-hidroxi-kaur-16-en-19-oico) (**2b**).

Considerando una potencial acción farmacológica del ácido grandiflorólico y de la mezcla de ácidos kaurenoico y traquilobánico (mezcla k/t), en una proporción 2:1, obtenida preliminarmente, se procedió a evaluar la variación estacional de ambos productos en las sumidades de la especie vegetal (Figuras 2, 3 y 4). Tanto en las hojas como en las flores de esta especie, los niveles de ácido grandifloró-

lico aumentaron significativamente aproximadamente tres veces en el otoño. Por otro lado se observó una disminución de este metabolito aproximadamente a la mitad en las cabezuelas sin semillas durante la misma estación. Cabe destacar que las mayores concentraciones de este terpeno se observaron en las cabezuelas sin semillas recolectadas en verano y en las hojas recolectadas en otoño. Paralelamente, se observó en las flores que los niveles de la mezcla k/t aumentaron al doble en el otoño, equiparándose a los niveles de ácido grandiflorólico durante el mismo periodo. En las hojas, sin embargo, se observó una disminución a la mitad de esta mezcla de metabolitos durante la estación otoñal. La mayor concentración de la mezcla k/t fue cuantificada en las cabezuelas sin semillas recolectadas durante la estación estival.

La Figura 5 resume los resultados obtenidos para el ensayo *in vivo* de los compuestos en estudio sobre el edema inducido por TPA en oreja de ratón. Cabe destacar que la administración tópica tanto de ácido kaurenico, ácido traquilobánico y de la mezcla k/t redujeron de forma significativa en un 50 % aproximadamente el edema producido por el TPA a la concentración de 1 mg/oreja.

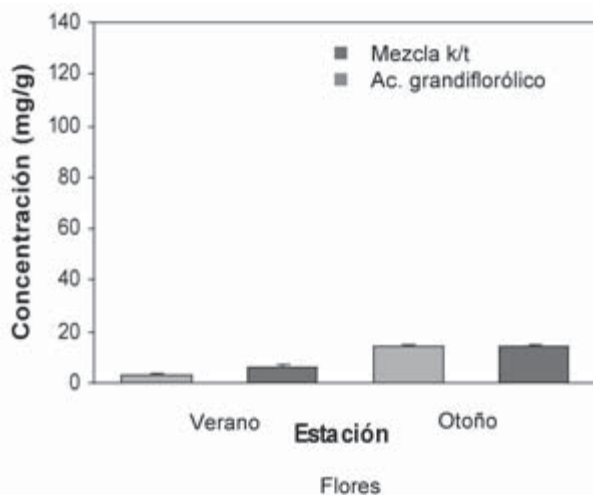


FIGURA 2. Variación estacional del ácido grandiflorólico y de la mezcla k/t en flores de *H. annuus L.*

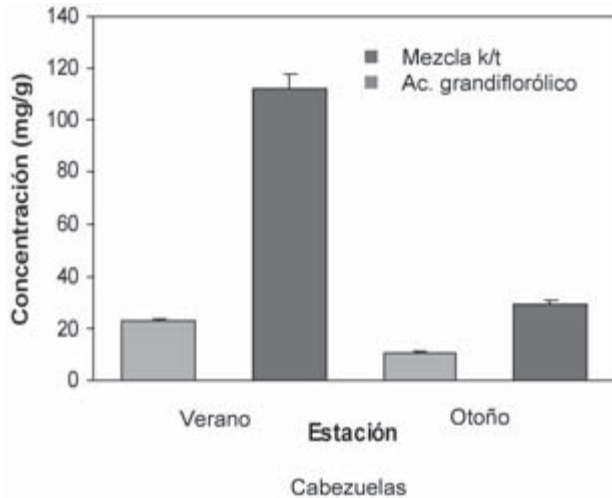


FIGURA 3. Variación estacional del ácido grandifloróico y de la mezcla k/t en cabezuelas sin semillas de *H. annuus L.*

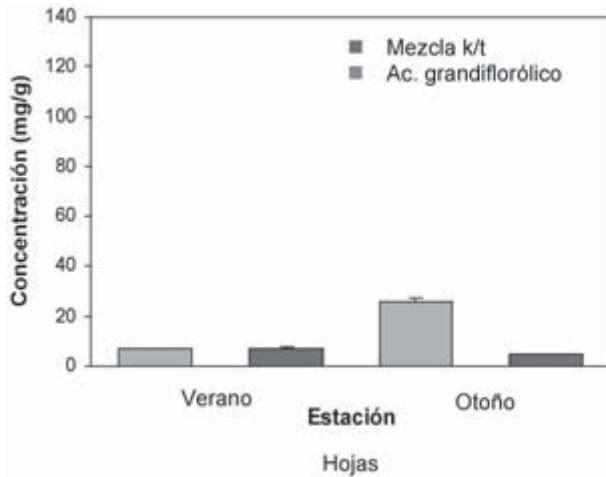


FIGURA 4. Variación estacional del ácido grandifloróico y de la mezcla k/t en hojas de *H. annuus L.*

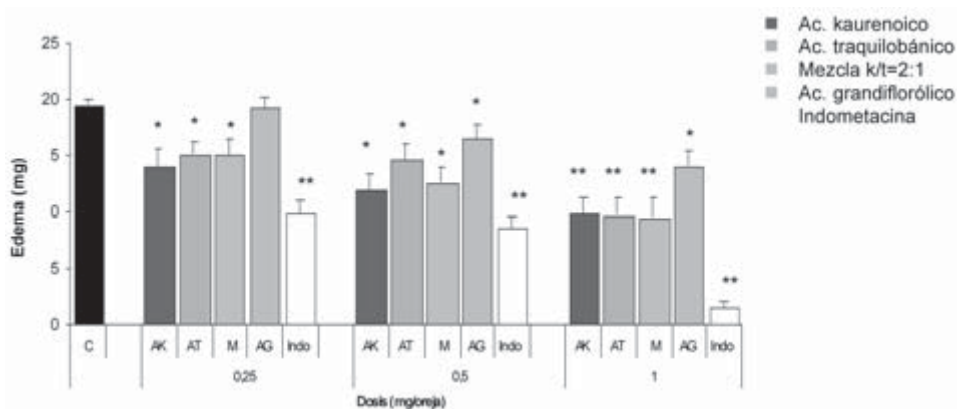


FIGURA 5. Efecto de los terpenos ensayados en el edema inducido por TPA en oreja de ratón. Datos expresados como media ± E.S. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al grupo control.

Por otro lado, para el ensayo de infiltración leucocitaria, expresada en términos de actividad de la enzima mieloperoxidasa, el ácido kaurenoico redujo significativamente la actividad de esta enzima, disminuyendo significativamente la infiltración de estas células durante el desarrollo del proceso inflamatorio (Figura 6).

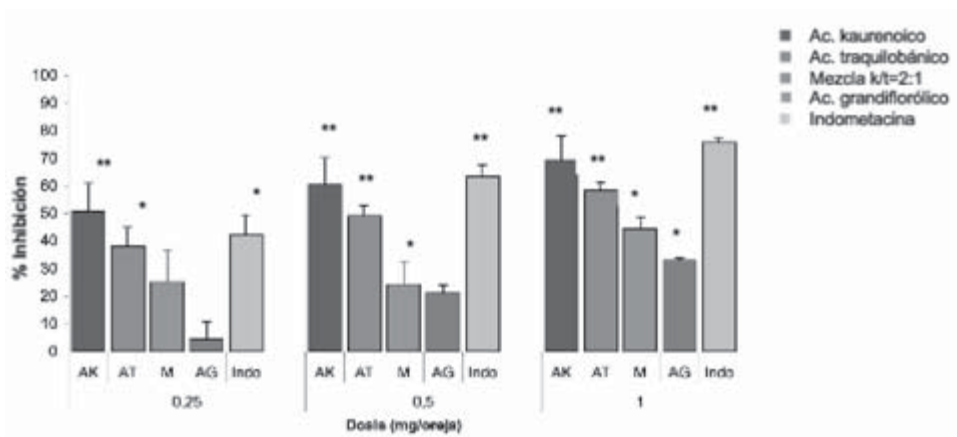


FIGURA 6. Efecto de los terpenos estudiados sobre la actividad mieloperoxidasa. Datos expresados como media ± E.S. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ respecto al grupo control.

Antes de proceder a la evaluación farmacológica *in vitro* de un compuesto, se debe estudiar la posible toxicidad celular del mismo. Los estudios de citotoxicidad se realizaron mediante el ensayo de MTT sobre una línea celular de macrófagos (Figuras 7 y 8).

Se investigó la posible actividad, tanto de los terpenos aislados como de los extractos, sobre la generación de NO, mediador implicado en el proceso inflamatorio. Las Figuras 9 y 10 resumen los resultados obtenidos para el ácido grandiflorólico y para el extracto metanólico, respectivamente. Ambos compuestos inhibieron significativamente la liberación de este mediador. Por otro lado, el ácido grandiflorólico mostró una ligera inhibición sobre la liberación de TNF- α a las dosis ensayadas.

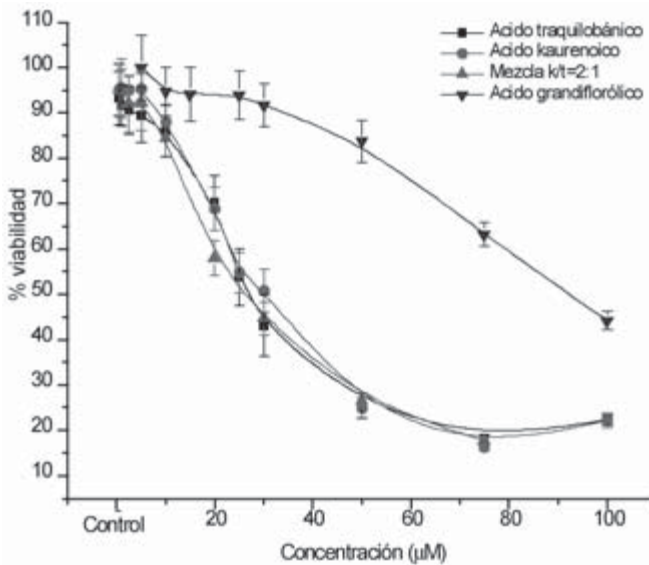


FIGURA 7. Efecto de los terpenos estudiados sobre la viabilidad celular en macrófagos.

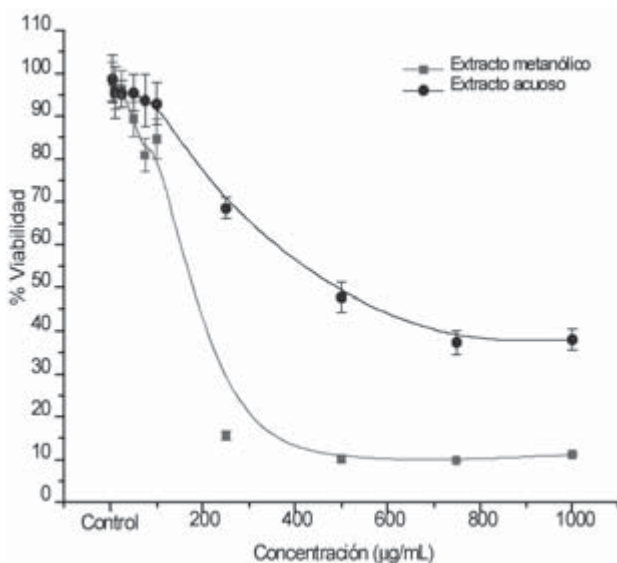


FIGURA 8. *Efecto de los extractos estudiados sobre la viabilidad celular en macrófagos.*

Los tres terpenos y la mezcla mostraron una inhibición significativa sobre la liberación de PGE_2 a las máximas concentraciones estudiadas. No obstante, el extracto metanólico inhibió significativamente la liberación de este mediador en todo el rango de concentraciones estudiadas. En base a estos resultados, al cuantificar el efecto de los compuestos estudiados sobre la actividad Ciclooxygenasa, se pretende demostrar si la inhibición de la PGE_2 observada, corresponde a la acción directa de los compuestos en estudio sobre las enzimas COX-1 y/o COX-2 semipurificadas. Tanto para el ácido traquilobánico como para el ácido kaurenoico, se observó una ligera inhibición de la actividad de ambas enzimas, reflejada en la liberación de PGE_2 . Ambos metabolitos inhiben en forma proporcional la actividad de ambas enzimas. Por otro lado, se observó que el ácido grandiflorólico presenta una mayor afinidad hacia la isoforma inducible que hacia la constitutiva, observándose una mayor inhibición de PGE_2 liberada por la activación de la COX-2. El extracto metanólico inhibió significativamente la liberación de PGE_2 mediada por la actividad de ambas isoformas enzimáticas. Como fármacos de referencia se utilizaron indometacina ($10 \mu M$) y nimesulida ($10 \mu M$).

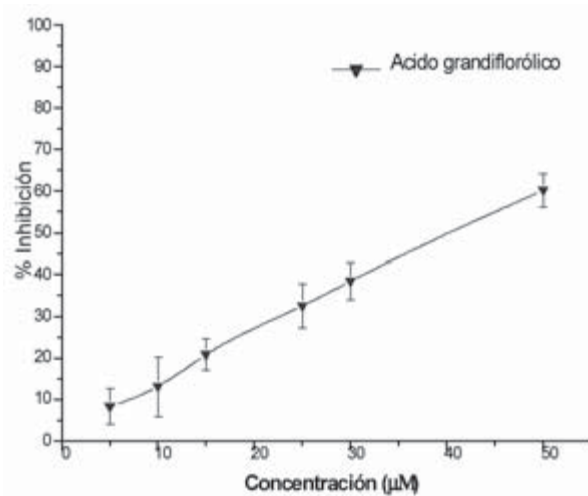


FIGURA 9. Efecto del ácido grandiflorólico sobre la generación de NO.

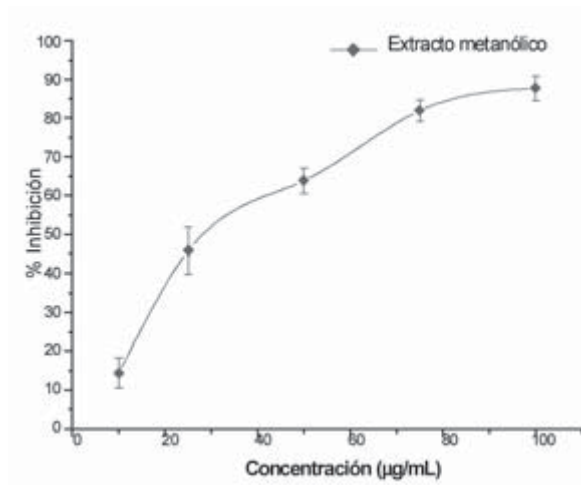


FIGURA 10. Efecto del extracto metanólico sobre la generación de NO.

DISCUSIÓN

La importancia actual de *Helianthus annuus* L., conocida como girasol, es de tipo económico, puesto que sus semillas son la materia prima para la obtención de aceite de uso culinario.

Los estudios científicos referidos a esta especie están mayoritariamente dirigidos a la genética y a la biotecnología. El girasol ha sido manipulado genéticamente con el fin de variar el contenido de un determinado ácido graso, mejorando su calidad y, al mismo tiempo, con fines benéficos para la salud humana. Los girasoles genéticamente modificados son más resistentes frente a plagas y a enfermedades propias de la planta (14), también se han desarrollado semillas híbridas de girasol de diferentes tamaños para hacer frente a algunos depredadores (15). En la actualidad se ha llegado a introducir genes de girasol que codifican para aminoácidos ricos en azufre, como metionina y cisteína, para incrementar el valor nutritivo de algunas leguminosas pobres en estos aminoácidos (16). Estudios anteriores, evaluaron la actividad antimicrobiana tanto del ácido kaurenico como del traquilobánico sobre cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, etc.) y sobre cepas fúngicas (*Candida albicans*) (17), encontrándose que ambos ácidos poseían equivalente potencia contra la cepa bacteriana. Por otro lado, sus ésteres metílicos presentaban una baja actividad sobre esta misma cepa. No se encontraron indicios de actividad antifúngica. Tomando como base esta información, se eligió trabajar con los ácidos libres y no con sus ésteres metílicos. También se estudió la acción de estos diterpenos sobre el crecimiento larvario de algunos lepidópteros, causantes de plagas que afectan el cultivo de esta especie vegetal (18), encontrándose que, tanto el ácido kaurenico como el traquilobánico inhibían significativamente el desarrollo de estas plagas. Lo anterior condujo al estudio científico de esta especie vegetal.

La inflamación es un proceso fisiopatológico complejo, mediado por una variedad de señales celulares producidas por leucocitos, macrófagos, mastocitos, plaquetas y linfocitos, así como por la activación de factores del complemento, conduciendo a la formación de edema como resultado de la extravasación de fluido y proteínas, y a la acumulación de leucocitos en el foco inflamatorio (19, 20). Los macrófagos, por su parte, juegan un papel muy importante durante el desarrollo del proceso inflamatorio, puesto que, una vez activados por citoquinas proinflamatorias o componentes bacteriales como el LPS, promueven la síntesis y liberación de mediadores químicos de la inflamación, como NO, eicosanoides y citoquinas (TNF- α) (21, 22).

Por todo lo expuesto en este trabajo de investigación, se ha iniciado el estudio farmacológico, tanto del ácido grandiflorólico como del extracto metanólico de hojas de *Helianthus annuus* L., como posibles agentes antiinflamatorios.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, al Instituto de Química Orgánica General «Manuel Lora-Tamayo», perteneciente al CSIC, y al programa MECESUP UVA 0207 del Ministerio de Educación de la República de Chile.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) VILLAR, A. M.; BERMEJO, P. y CARRETERO, M. E. (1999): Farmacognosia, conceptos generales. En: Villar del Fresno, A. M., editor. *Farmacognosia General*. Madrid: Editorial Síntesis, p. 19.
- (2) PYREK, J. S. (1970): New pentacyclic diterpene acid trachyloban-19-oic acid from sunflower. *Tetrahedron*. 26: 5029-5032.
- (3) MARTÍN PANIZO, F. y RODRÍGUEZ, B. (1979): Diterpene compounds of the sunflower (*Helianthus annuus* L.). *An. Quim.* 75: 428-430.
- (4) DE LAS HERAS, B.; RODRÍGUEZ, B.; BOSCA, L. y VILLAR, A. M. (2003): Terpenoids: Sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Curr. Med. Chem.* 3: 171-185.
- (5) DE LAS HERAS, B.; ABAD, M. J.; SILVÁN, A. M.; PASCUAL, R.; BERMEJO, P.; RODRÍGUEZ, B. y VILLAR, A. M. (2001): Effects of six diterpenes on macrophage eicosanoid biosynthesis. *Life Sci.* 70: 269-278.
- (6) ESCRIG, V.; UBEDA, A.; FERRANDIZ, M. L.; DARIAS, J.; SÁNCHEZ, J. M.; ALCARAZ, M. J. y PAYÁ, M. (1997): Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A₂ with anti-inflammatory activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282: 123-131.
- (7) LUCAS, R.; GIANNINI, C.; D'AURIA, M. V. y PAYÁ, M. (2003): Modulatory effect of bolinaquinone, a marine sesquiterpenoid, on acute and chronic inflammatory processes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 1172-1180.
- (8) KUBO, I.; GANJIAN, I. y KUBOTA, T. (1982): Chemotaxonomic significance of ent-kaurene diterpenes in *Rabdosia umbrosus* varieties. *Phytochemistry* 21: 81-83.
- (9) RECIO, M. D.; GINER, R. M.; MANEZ, S. y RÍOS, J. L. (1994): Structural considerations on the iridoids as antiinflammatory agents. *Planta Med.* 60: 232-234.

- (10) GIL, B.; SANZ, M. J.; TERENCIO, M. C., DEGIULIO, A.; DEROSA, S.; ALCARAZ, M. J. y PAYA, M. (1995): Effects of marine 2-Polyprenyl-1, 4-hydroquinones on phospholipase A₂ activity and some inflammatory responses. *Eur. J. Pharmacol.* 285: 281-288.
- (11) SCUDIERO, D. A.; SHOEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D. y BOYD, M. R. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48: 4827-33.
- (12) HATTORI, Y. y NAKANISHI, N. (1995): Effects of cyclosporine-A and Fk506 on nitric-oxide and tetrahydrobiopterin synthesis in bacterial lipopolysaccharide-treated J774 macrophages. *Cell. Immunol.* 165: 7-11.
- (13) GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. y TANNENBAUM, S. R. (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [N-15]-labeled nitrate in biological-fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138.
- (14) BURKE, J. M. y RIESEBERG, L. H. (2003): Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300: 1250.
- (15) ALEXANDER, H. M.; CUMMINGS, C. L.; KAHN, L. y SNOW, A. A. (2001): Seed size variation and predation of seeds produced by wild and crop-wild sunflowers. *Am. J. Bot.* 88: 623-627.
- (16) MOLVIG, L., TABE, L. M., EGGUM, B. O., MOORE, A. E., CRAIG, S., SPENCER, D., and HIGGINS, T. J. (1997): «Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 8393-8398.
- (17) MITSCHER, L. A.; RAO, G. S. R.; VEYSOGLU, T.; DRAKE, S. y HAAS, T. (1983): Isolation and identification of trachyloban-19-oic and (-)-Kaur-16-en-19-oic acids as anti-microbial agents from the prairie sunflower, *Helianthus annuus* L. *J. Nat. Prod.* 46: 745-746.
- (18) ELLIGER, C. A.; ZINKEL, D. F.; CHAN B. G. y WAISS JR., A. C. (1976): Diterpene acids as larval growth inhibitors. *Experientia.* 32: 1364-1366.
- (19) COUSSENS, L. M. y WERB, Z. (2002): Inflammation and cancer. *Nature.* 420: 860-867.
- (20) NATHAN, C. (2002): Points of control in inflammation. *Nature.* 420: 846-852.
- (21) LASKIN, D. L. y PENDINO, K. J. (1995): Macrophages and inflammatory mediators in tissue-injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 655-677.
- (22) MACMICKING, J.; XIE, Q. W. y NATHAN, C. (1997): Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.