

## Perfil vasodilatador del extracto y la fracción flavonoide acetilada obtenida de *Calea prunifolia* HBK

INGRID L. ONZAGA, MD, MSc<sup>1</sup>, JAVIER RINCÓN, QF, PhD<sup>2</sup>, MARIO F. GUERRERO, MD, DSc<sup>2</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** Este estudio muestra el perfil vasodilatador en anillos aislados de aorta de ratas *Wistar* del extracto etanólico y de la fracción de flavonoides acetilada de *Calea prunifolia* HBK, especie utilizada popularmente en Colombia para el tratamiento de hipertensión arterial.

**Objetivos:** Estudiar posibles mecanismos de acción inducidos por el extracto etanólico y la fracción flavonoide acetilada de *C. prunifolia* en anillos aislados de aorta de rata.

**Metodología:** Luego de verificar el efecto hipotensor del extracto etanólico de *C. prunifolia* en ratas anestesiadas, se estudió la respuesta inducida por concentraciones crecientes (1 µg/ml–100 mg/ml) del extracto y la fracción flavonoide acetilada de *C. prunifolia* en anillos íntegros y en anillos sin endotelio expuestos a KCl (80 mM) o fenilefrina (1 µM). Adicionalmente, los anillos se preincubaron con una de las siguientes sustancias: L-NAME (0.1 mM, inhibidor de NO-sintetasa), azul de metileno (1 µM, inhibidor de guanilil-ciclasa), glibenclamida (1 µM, inhibidor de canales K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), atropina (30 µM, antagonista muscarínico), propranolol (1 µM, bloqueador de receptor β), o indometacina (1 µM, inhibidor de ciclooxigenasa), así como la respuesta inducida por CaCl<sub>2</sub> en solución de Krebs sin Ca<sup>2+</sup> en presencia del extracto o de la fracción.

**Resultados:** El extracto de *C. prunifolia* disminuyó en función de la dosis (5-75 mg/kg, iv.) la presión arterial sin afectar la frecuencia cardíaca en ratas *Wistar* anestesiadas. Tanto el extracto como la fracción flavonoide relajaron anillos de aorta precontraídos con KCl (80 mM) y fenilefrina (1 µM) con valores de CI<sub>50</sub> de 35 y 67 µg/ml, y 34 y 66 µg/ml, respectivamente. Los mayores efectos, tanto del extracto como de la fracción, se observaron en anillos contraídos con CaCl<sub>2</sub>.

**Discusión:** Los resultados sugieren que los compuestos flavonoides acetilados juegan un papel clave en el efecto vasodilatador inducido por el extracto etanólico de *C. prunifolia*, en apariencia por mecanismos especialmente vinculados con antagonismo de canales de calcio.

**Palabras clave:** Flavonoides; Óxido nítrico; Canales de calcio; Vasorelajación; Ratas *Wistar*; Hipertensión.

*Vasorelaxant profile of the extract and an acetylated flavonoid fraction obtained from Calea prunifolia HBK*

### SUMMARY

**Introduction:** This study shows the vasorelaxant profile in isolated aortic rings from *Wistar* rats of the ethanolic extract and the acetylated flavonoid fraction obtained from *Calea prunifolia*, specie used in Colombian folk medicine for the treatment of arterial hypertension.

**Objectives:** To study possible action mechanisms implicated in the response induced by the ethanolic extract and the acetylated flavonoid fraction obtained from *C. prunifolia* in isolated aortic rings.

**Methodology:** After verifying the hypotensive effect of the ethanolic extract in anaesthetized rats, the response induced by the extract and the acetylated flavonoid fraction (1 µg/ml-100 mg/ml) in isolated aortic rings from *Wistar* rats contracted with KCl (80 mM) or phenylephrine (1 µM) was studied. Then, the effect of the extract and the fraction was assessed in deendothelized rings contracted with KCl or in intact rings contracted with KCl (80 mM) and preincubated with one of the following substances: L-NAME (0.1 mM, NO-sintasa inhibitor), methylene blue (1 µM, guanyl ciclasa inhibitor), glibenclamide

1. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.  
e-mail: ingrid\_onzaga@hotmail.com

2. Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. e-mail: mfguerrerop@unal.edu.co jrinconv@unal.edu.co

Recibido para publicación junio 15, 2007 Aceptado para publicación enero 31, 2008

(1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  channel inhibitor), atropine (30  $\mu\text{M}$ , muscarinic antagonist), propranolol (1  $\mu\text{M}$ ,  $\beta$  receptor blocker), or indomethacin (1  $\mu\text{M}$ , COX inhibitor). The response induced in rings contracted with  $\text{CaCl}_2$  in Krebs solution without  $\text{Ca}^{2+}$  also was analysed.

**Results:** The ethanolic extract elicited a dose-response (5-75 mg/kg. iv.) decrease in the blood pressure levels without affecting heart rate in anaesthetized rats. Both, extract and fraction relaxed KCl (80 mM) and phenylephrine (1  $\mu\text{M}$ ) precontracted isolated aorta rings with  $\text{IC}_{50}$  of 35 and 67  $\mu\text{g}/\text{ml}$  against KCl and 34 and 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$  against phenylephrine, respectively. Rings exposed to  $\text{CaCl}_2$  in Krebs' solution without  $\text{Ca}^{2+}$  showed the better response induced by both extract and fraction.

**Discussion:** These results suggest that acetylated flavonoid compounds play a key role in the vasorelaxant effect induced by *C. prunifolia* by mechanisms mainly related to calcium channels antagonism.

**Keywords:** *Flavonoids; Nitric oxide; Calcium channels; Vasodilation; Wistar rats; Hypertension.*

Los trastornos cardiovasculares constituyen la primera causa de morbimortalidad en países industrializados y la hipertensión arterial es su principal factor de riesgo. En Colombia han desplazado a la violencia como primera causa<sup>1,2</sup>. Aunque medidas no farmacológicas tales como el control de peso, la restricción en el consumo de sodio, la moderación en el consumo de alcohol y el ejercicio ayudan a disminuir la presión arterial, casi todos los pacientes requieren medicación adicional<sup>3</sup>. Hay una variedad de grupos farmacológicos que incluyen a diuréticos, antagonistas de canales de calcio, antagonistas del receptor  $\beta$ , inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de angiotensina II, que si se utilizan de manera adecuada, de acuerdo con las características particulares de cada paciente, logran modificar el curso de la enfermedad<sup>4</sup>. Sin embargo, un importante número de individuos permanece vulnerable a las complicaciones de la hipertensión arterial o a los efectos adversos de esos fármacos<sup>5</sup>. Por tanto es necesario encontrar nuevas alternativas terapéuticas para disminuir el impacto de este trastorno y los productos naturales pueden ser una fuente importante de ellas, si se tiene en cuenta que poseen una gran diversidad química y representan todavía aproximadamente la mitad de los fármacos en uso, proporción que alcanza 75% en el caso de los que se emplean en trastornos cardiovasculares<sup>6,7</sup>. Para Co-

lombia, uno de los países de mayor biodiversidad mundial, este hecho representa una ventaja estratégica.

Entre las plantas utilizadas por la tradición popular en Colombia para la hipertensión se encuentran varias especies del género *Calea*, conocidas como «carrasposas»<sup>8</sup>. Trabajos previos mostraron efectos antihipertensivos y vasodilatadores de *C. glomerata*, así como la presencia de metabolitos de tipo flavonoide en *C. prunifolia* (*C. jamaicensis*)<sup>9,10</sup>. Se ha documentado ampliamente que ciertos compuestos de naturaleza flavonoide poseen propiedades antioxidantes, vasodilatadoras, antihipertensivas y antiateromatosas<sup>11</sup>. Esto llevó a plantear que *C. prunifolia*, así como *C. glomerata*, pueden ejercer efectos hipotensores y vasodilatadores y que los compuestos flavonoides son, cuando menos parte de sus principios activos. Con este propósito se evaluó el efecto inducido por el extracto etanólico obtenido de *C. prunifolia* sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca en ratas anestesiadas, así como la respuesta inducida tanto por el extracto como por la fracción flavonoide acetilada en la preparación de anillos aislados de aorta de rata.

Con el fin de estudiar posibles mecanismos de acción, se analizó el comportamiento del extracto y la fracción flavonoide acetilada en protocolos vasculares que examinan el papel del endotelio, el óxido nítrico, el GMPc, los canales de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ , el receptor muscarínico, el receptor  $\beta$ , las prostaglandinas y los canales de calcio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal y extracción.** El material vegetal se recolectó en Cunday (Tolima, Colombia) y se clasificó en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia donde reposa un ejemplar (col 468655). Las partes aéreas (tallos y hojas) se secaron en un horno de aire circulante a 40-50°C durante 24 horas y después se trituraron en un molino de discos. El material obtenido (1839 g) se colocó en un percolador con etanol 95% y la solución resultante se secó a vacío en un evaporador rotatorio.

El extracto etanólico se trató con una mezcla de solventes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ ) y la fracción acuosa se extrajo con butanol. La porción butanólica resultante se purificó por cromatografía en columna (sílica gel 60 0.063-0.200 mm), y se obtuvo una fracción rica en flavonoides,

según los análisis por cromatografía en capa delgada, revelador (NP-PEG) infrarrojo y resonancia magnética nuclear (RMN)<sup>10,12,13</sup>.

**Fracción de flavonoides acetilada.** Una porción de fracción de flavonoides se acetiló mediante tratamiento durante 24 horas, con 2 ml de anhídrido acético y 2 ml de piridina. La fase orgánica obtenida se extrajo sucesivamente con diclorometano (x3), HCl 10%, (x3), agua destilada y se secó con sulfato de sodio anhidro. Finalmente se sometió a evaporación a vacío. La fracción acetilada se examinó por infrarrojo y se sometió a experimentos por RMN de hidrógeno y carbono-13.

**Medición de presión arterial y frecuencia cardíaca.** Se utilizaron diez machos normotensos de ratas Wistar (250-340 g) suministrados por el bioterio del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional que se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (100 mg/kg) y diazepam (5 mg/kg) y a los que les canuló la tráquea para facilitar la respiración espontánea. Luego se les implantaron sendos catéteres (PE-50) en la arteria carótida izquierda y la vena yugular derecha para el registro de la presión arterial y la administración de sustancias, respectivamente. Efectuada la canulación vascular, se les administró profilácticamente solución heparinizada (1000 u/ml; 0.01 ml/10 g de peso).

La presión arterial se registró a través de un transductor (T42-20, *Coulbourn Instruments*) que se conectó a un amplificador de señal (S77-34 CI) y se acopló a un puerto de conversión análogo digital (L25-08 CI) cuya señal se examinó a través del programa de computador CODAS (Videograph II, CI). La frecuencia cardíaca se obtuvo del módulo de presión a través de un tacómetro (S77-26 CI). La presión arterial media se calculó según la fórmula diastólica + [(sistólica-diastólica)/3].

Una vez obtenida una señal basal estable de presión arterial y frecuencia cardíaca, aproximadamente a los 10-12 minutos de iniciado el registro, a cada animal se le administraron cada 15 minutos, dosis crecientes (5, 10, 20, 50, 75 mg/kg, iv) del extracto o del vehículo, que se utilizó como control (una mezcla de glicerina 10%, polipropilenglicol 10% y sorbitol 2%, en agua destilada). El volumen de administración fue 0.01 mg/10 g de peso. Para el análisis de los datos se registraron los cambios máximos de presión arterial y frecuencia cardíaca entre cada intervalo de administración.

**Preparación de anillos aislados de aorta.** Se utilizaron en total 20 machos de ratas Wistar (250-300 g). A cada animal, previa anestesia con éter y sacrificio por decapitación, se le disecó la arteria aorta torácica que se seccionó y colocó en una caja de Petri, donde se le retiró la grasa y el tejido conectivo adyacente. Allí se cortó en anillos de cuatro a seis mm de longitud, obteniéndose entre seis y ocho fragmentos por arteria. Los anillos se sumergieron en un sistema en serie de cámaras de órgano aislado que contenía cada una 10 ml de solución de Krebs gasificada con una mezcla carbógena (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub>, 5%) a 37°C. La solución de Krebs se preparó con la siguiente composición (mM): NaCl, 118.0; KCl, 4.75; CaCl<sub>2</sub>, 1.8; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; glucosa, 11 y ácido ascórbico 0.1 (pH=7.4).

Los anillos se fijaron por su luz mediante dos alambres finos de acero inoxidable, el uno se ancló a la base de la cámara y el otro se acopló a un transductor isométrico (Harvard UF1) conectado a su vez con el sistema de registro por computador (Videograph II CODAS CI). Se les aplicó una tensión basal de dos gramos, se permitió un tiempo de estabilización de 60 minutos y se efectuaron cambios de la solución fisiológica cada 15 minutos. En algunos anillos se retiró el endotelio por raspado cuidadoso de la superficie interna con pinzas finas, procedimiento que se verificó posteriormente por la ausencia de relajación en presencia de acetilcolina (1 μM).

Una vez obtenido el equilibrio, los anillos se incubaron con fenilefrina (1 μM) o KCl (80 mM) hasta alcanzar una meseta estable de contracción. Entonces se adicionó el extracto o la fracción en forma acumulativa (1, 10, 30, 100, 300 μg/ml). En algunos anillos se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO, 0.1%) como control.

Para examinar la participación de mecanismos relacionados con la vía NO/GMPc, se siguió un protocolo similar en anillos que se estimularon con KCl previamente incubados durante 20 minutos con clorhidrato del metilester de Nω-nitro-L-arginina, (L-NAME, 100 μM, inhibidor de NO sintetasa) o azul de metileno (1 μM, inhibidor de guanilil ciclasa). Adicionalmente, para examinar posibles interacciones con canales de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>, prostaglandinas, receptor β o receptor muscarínico, los anillos se preincubaron durante 20 minutos con glibenclamida (1 mM, antagonista de canales K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), indometacina (10 μM, inhibidor COX), propranolol (1 μM, antagonista del receptor β) o atropina (30 μM,

antagonista del receptor muscarínico).

Por último, para evaluar posibles interacciones con calcio, los anillos se expusieron a una solución de Krebs desprovista de calcio, con EDTA (0.03 mM) y KCl (60 mM) a la que se adicionó  $\text{CaCl}_2$  en concentraciones crecientes ( $10^{-4}$ ,  $3 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $3 \times 10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M).

Todos estos procedimientos se efectuaron según las normas de protección de animales de laboratorio estipuladas en la Ley 84 de la Constitución de Colombia y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud.

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Se efectuó una curva dosis-respuesta de presión arterial y frecuencia cardíaca expresada como porcentaje de cambio con respecto al valor de la línea de base, tras cada administración. La respuesta de los anillos aislados de aorta, se formuló asimismo como porcentaje de cambio con respecto a la línea de base alcanzada con la meseta de contracción de KCl (80 mM) o fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ). A partir de estas curvas se efectuó un análisis de regresión semilogarítmica para obtener la concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ) de relajación y su correspondiente  $\text{pD}_2$  (logaritmo negativo de la  $\text{CE}_{50}$ ) del extracto o de la fracción, en presencia o en ausencia de las sustancias de incubación descritas anteriormente. También se determinó el efecto máximo ( $\text{E}_{\text{max}}$ ) inducido por el extracto o la fracción, en presencia o ausencia de esas sustancias.

Todos los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  el error medio estándar (ems). Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a las variables de presión arterial, frecuencia cardíaca y contracción de los anillos vasculares, con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ . Los datos se procesaron en los programas Excel<sup>(R)</sup> y SPSS<sup>(R)</sup>.

**Reactivos y sales.** Se utilizaron las siguientes sales: NaCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , glucosa; KCl,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$ , ácido ascórbico, clorhidrato de fenilefrina, cloruro de acetilcolina, indometacina, L-NAME, dimetilsulfóxido, clorhidrato de propranolol y sulfato de atropina (Merck<sup>(R)</sup>). El extracto y la fracción se disolvieron en DMSO (0.1%) en las pruebas *in vitro*. Las demás sustancias se prepararon en solución salina normal.

## RESULTADOS

**Estudio fitoquímico.** Los ensayos realizados permi-

tieron descubrir la presencia de flavonoides, terpenos/esteroles, lactonas terpénicas y taninos. De la fracción butanólica se pudo determinar una alta concentración de flavonoides que se confirmó por cromatografía en capa delgada y análisis de los espectros infrarrojo y de RMN. Los flavonoides presentes en la fracción butanólica se acetilaron, procedimiento que se confirmó por cromatografía en capa delgada y RMN.

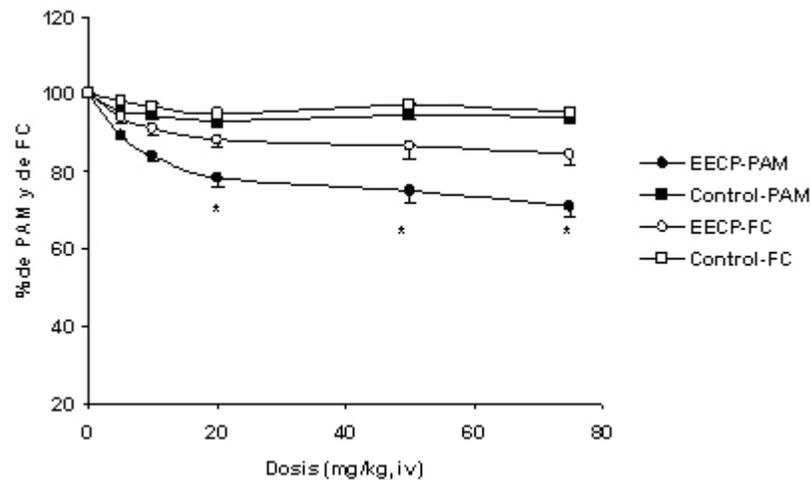
**Efecto del extracto sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca.** En ratas Wistar ( $n=10$ ) los valores promedio de presión arterial y frecuencia cardíaca fueron respectivamente  $69 \pm 2$  mm Hg y  $337 \pm 8$  ppm. El extracto produjo una disminución significativa de la presión arterial entre 5 y 20 mm Hg en función de la dosis (5-75 mg/kg, iv) sin afectar significativamente la frecuencia cardíaca (Gráfica 1).

**Efectos del extracto y de la fracción en anillos aislados de aorta.** Las contracciones máximas obtenidas con KCl (80 mM) y fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) en anillos intactos de aorta fueron  $2312 \pm 23$  y  $2243 \pm 80$  mg, respectivamente ( $n=30$  anillos). Tanto el extracto como la fracción produjeron una respuesta relajante similar frente a estos agentes, con  $\text{CI}_{50}$  de 35 [32-38] y 34 [24-50]  $\mu\text{g/ml}$  frente a KCl y 67 [61-74] y 66 [61-71]  $\mu\text{g/ml}$  frente a fenilefrina (Gráfica 2).

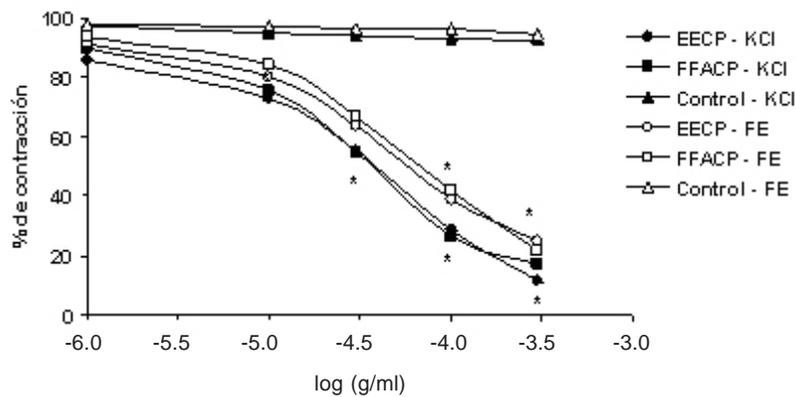
Las potencias y eficacias de relajación del extracto y de la fracción fueron mayores en anillos intactos que en anillos sin endotelio ( $\text{pD}_2$ : 4.46 y 4.47 vs. 3.26 y 3.24;  $\text{E}_{\text{max}}$ : 91.9% y 89.7% vs. 35% y 35%; Cuadro 1). Estos parámetros también se modificaron significativamente en presencia de: propranolol (1  $\mu\text{M}$ ), atropina (30  $\mu\text{M}$ ), indometacina (1  $\mu\text{M}$ ), glibenclamida (1  $\mu\text{M}$ ), L-NAME (0.1 mM) y azul de metileno (1  $\mu\text{M}$ ) con valores de  $\text{pD}_2$  entre 1.74 y 3.78 y de  $\text{E}_{\text{max}}$  entre 32.5% y 57.8% (Cuadro 1), siendo más ostensibles los efectos de atropina y propranolol. Además, tanto el extracto como la fracción inhibieron en función de la dosis (1-30  $\mu\text{g/ml}$ ), la respuesta inducida por  $\text{CaCl}_2$  en anillos íntegros hasta reducirla a valores de  $\text{E}_{\text{max}}$  de 12% y 7% (Gráfica 3).

## DISCUSIÓN

Este estudio demuestra efectos hipotensores en función de la dosis del extracto etanólico de *C. prunifolia* en ratas Wistar anestesiadas y efectos vasodilatadores del extracto y de la fracción rica en flavonoides en la preparación de anillos aislados de aorta. La respuesta



**Gráfica 1.** Efectos inducidos por el extracto etanólico obtenido de *C. prunifolia* (EECP) sobre los porcentajes de presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC) tras la administración vía intravenosa (5-75 mg/kg) en ratas Wistar anestesiadas. Los valores basales de PAM y FC fueron respectivamente de:  $69 \pm 2$  mm Hg y  $337 \pm 8$  PPM. Cada punto representa el promedio  $\pm$  ems de  $n=5$ ;  $*p < 0.05$  frente al control (vehículo: glicerina 10%, PPG 10%, polisorbato 2%).



**Gráfica 2.** Efectos inducidos por el extracto etanólico y la fracción flavonoide acetilada de *C. prunifolia* (EECP y FFACP) en anillos aislados de aorta de ratas Wistar contraídos con fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ) y KCl (80 mM). Las fases de meseta obtenidas (100% de contracción) fueron  $2243 \pm 80$  y  $2312 \pm 23$  mg, respectivamente. Cada punto representa el promedio  $\pm$  ems de  $n: 5-7$  anillos,  $*p < 0.05$  frente al control (DMSO, 0.1%).

inducida por el extracto tiene interés no sólo desde el punto de vista de la variable de presión arterial, que se reduce significativamente, sino también por el comportamiento de la frecuencia cardíaca, que no se afecta mayormente, y permite plantear que si la hipotensión observada se debiera sólo a efectos vasodilatadores, se esperaría un incremento reflejo de la frecuencia cardíaca, como suele ocurrir con los agentes vasodilatadores. Se sabe que la taquicardia simpática refleja se relaciona con el fenómeno de remodelado cardiovascular, pues el

incremento en el retorno venoso que obra como consecuencia del efecto vasodilatador, desencadena, además del reflejo atrial, sobrecarga de volumen que, en un miocardio sometido a exceso de tensión, se traduce en la hipertrofia no funcional característica del remodelado<sup>14</sup>. Desde esa perspectiva es útil encontrar sustancias antihipertensivas que no induzcan taquicardia. Parece ser ese el caso del extracto de *C. prunifolia*.

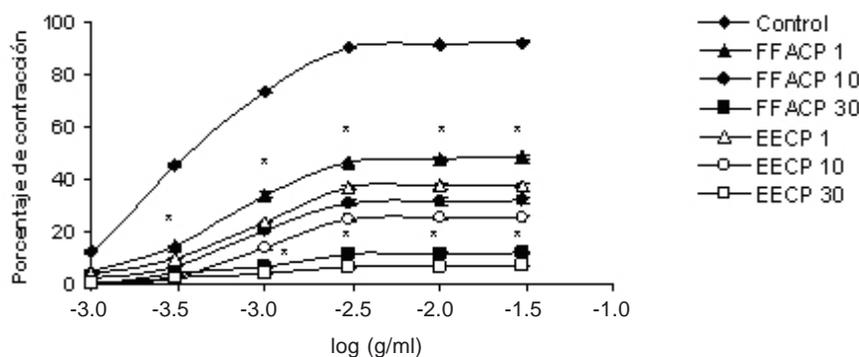
Paralelamente, el extracto y la fracción relajaron de modo similar anillos aislados de aorta contraídos tanto

Cuadro 1

Efecto de las sustancias en los valores de  $pD_2$  y  $E_{max}$  inducido por el extracto etanólico (EECP) y la fracción flavonoide acetilada (FFACP) de *C. prunifolia* en anillos aislados de aorta de ratas Wistar

	$Pd_2$ EECP	FFCP	% $E_{max}$ EECP	FFCP
+ Endotelio	4.46 ± 0.04	4.47 ± 0.16	91.9 ± 1.2	89.7 ± 1.3
- Endotelio	3.26 ± 0.03*	3.24 ± 0.04*	35.0 ± 1.9*	35.0 ± 0.9*
Atropina	2.38 ± 0.02*	1.74 ± 0.37*	34.8 ± 1.7*	33.4 ± 0.8*
Propranolol	2.33 ± 0.03*	2.64 ± 0.09*	32.5 ± 1.0*	35.6 ± 1.2*
Indometacina	3.52 ± 0.01*	3.55 ± 0.05*	50.0 ± 1.4*	50.0 ± 1.4*
Glibenclamida	3.69 ± 0.04*	3.43 ± 0.07*	60.2 ± 1.0*	52.4 ± 0.8*
L name	3.77 ± 0.01*	3.62 ± 0.01*	54.9 ± 2.3*	52.6 ± 0.9*
Azul metileno	3.78 ± 0.01*	3.57 ± 0.06*	57.8 ± 1.6*	50.5 ± 0.7*

\* $p < 0.05$ ; n: 5-7.



Gráfica 3. Efecto de  $CaCl_2$  en anillos aislados de ratas Wistar en presencia o ausencia del extracto etanólico o de la fracción flavonoide acetilada de *C. prunifolia* (EECP y FFACP) 1, 10 y 30  $\mu g/ml$ , respectivamente. Cada punto representa el promedio  $\pm$  ems de n: 5-7 anillos; \* $p < 0.05$  frente a control (DMSO, 0.1%).

con KCl como con fenilefrina, lo que permite plantear, por un lado que ciertos compuestos flavonoides juegan un papel importante en los efectos vasodilatadores de *C. prunifolia*, y por otro, que los efectos antiadrenérgicos no parecen ser específicos sobre el receptor  $\alpha$ , en vista de la capacidad de la fracción para inhibir no sólo el agonista alfa adrenérgico utilizado: fenilefrina, sino también a KCl.

Los experimentos en anillos sin endotelio muestran que la respuesta vasodilatadora disminuye pero no se suprime totalmente, lo que sugiere que la relajación puede depender parcialmente de mecanismos vinculados con el endotelio. Al mismo tiempo, L-NAME (inhibidor de óxido nítrico sintetasa) revierte también,

apenas en parte, la relajación inducida por la fracción, de lo que se infiere que la vía del NO no parece ser el único ni el más importante de los mecanismos dilatadores comprometidos.

No se descartaría entonces que mecanismos de tipo mixto expliquen la vasodilatación observada. En vista de los experimentos con azul de metileno (inhibidor de GMPc), glibenclamida (antagonistas de canales  $K^+_{ATP}$ ), atropina (antagonista muscarínico), propranolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) e indometacina (inhibidor de COX) es posible que ciertas interacciones inespecíficas relacionadas con estos mediadores estén presentes, entre las que cabría destacar la facilitación muscarínica y  $\beta$  adrenérgica. De este modo, más de un principio

activo estaría implicado, hecho por lo demás visto con frecuencia en productos naturales. No obstante, son más notorios aún los resultados obtenidos frente a  $\text{CaCl}_2$  en solución de Krebs desprovista de calcio, en los que el extracto y la fracción apenas con 30  $\mu\text{g/ml}$  inhibieron en forma casi total la contracción inducida por el agente. Si estos datos se comparan con la respuesta frente a KCl y fenilefrina, sugieren que mecanismos que tienen que ver con canales de calcio de tipo «voltaje dependiente» estarían especialmente vinculados<sup>15</sup>.

Los efectos vasculares de varios compuestos de naturaleza flavonoide son bien conocidos<sup>11,16-18</sup>. Algunos de ellos están presentes en *Croton schiedeanus*, especie utilizada popularmente en Colombia para el tratamiento de la hipertensión<sup>19-25</sup>. Además, varios de estos compuestos ejercen otros efectos cardiovasculares como la disminución de LDH y la agregación plaquetaria, lo que favorece su perfil en trastornos cardiovasculares como hipertensión arterial y enfermedad coronaria. Varias de esas propiedades se atribuyen a su capacidad para captar radicales libres<sup>11,26</sup>.

En el caso de *C. prunifolia*, sin duda, los compuestos flavonoides desempeñan un papel notorio en sus efectos vasodilatadores. Sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que, aunque los mecanismos captadores de radicales libres podrían explicar interacciones a favor de su respuesta vasodilatadora, entre ellas, la vía del NO/GMPc, es necesario considerar blancos farmacológicos a nivel de canales de calcio.

En conclusión, el extracto etanólico obtenido de *C. prunifolia* ejerce efectos hipotensores en ratas anestesiadas así como efectos vasodilatadores en la preparación de anillos aislados de aorta. Ante el perfil de la respuesta inducida por la fracción flavonoide acetilada, los compuestos de esta naturaleza desempeñan un papel sustancial. Aunque una mezcla de mecanismos podría estar implicada, tales como interacciones frente a la vía NO/GMPc e interacciones muscarínicas y antiadrenérgicas, los efectos inhibitorios frente a canales de calcio «dependientes de voltaje» parecen ser los predominantes. Estos resultados dan soporte al uso etnobotánico de esta especie.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo tuvo el apoyo de la *International Foundation for Sciences* (IFS), Colciencias y de la

Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia. Los autores expresan su agradecimiento al grupo *Principios Bioactivos en Plantas*.

## REFERENCIAS

1. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. *Defunciones por grupos de edad y sexo, según lista de causas agrupadas 6/67*. CIE-10 de OPS 2002.
2. Bautista LE, Vera-Cala LM, Villamil L, Silva SM, Pena IM, Luna LV. Risk factors associated with the prevalence of arterial hypertension in adults in Bucaramanga, Colombia. *Salud Publica Mex* 2002; 44: 399-405.
3. Marvin M. Effective treatment of hypertension without medication: is it possible? *J Clin Hypertens*. 2004; 6: 219-21.
4. JNC VII. *The seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure*. NIH Publication Nº 04-5230. Washington, DC: US Department of Health and Human Services; 2004.
5. Almgren T, Persson B, Wilhelmson L, Rosengren A, Andersson OK. Stroke and coronary heart disease in treated hypertension -a prospective cohort study over three decades. *J Intern Med*. 2005; 257: 496-502.
6. Alice MC. Natural products as a resource for new drugs. *Pharm Res*. 1996; 13: 1133-41.
7. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003; 66: 1022-37.
8. García B. *Flora medicinal colombiana*. Vol 3. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1975. p. 323-4.
9. Guerrero MF, Puebla P, Carron R, Martín ML, Arteaga L, Roman LS. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2002; 80: 37-42.
10. Rivera L, Rojas M. *Contribución al estudio fitoquímico de la actividad antimalárica del extracto etanólico de las partes aéreas de Calea prunifolia*. Trabajo de Grado. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá; 2002.
11. Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52: 673-751.
12. Agrawal PK. *Carbon-13 NMR of flavonoids*. Amsterdam: Elsevier; 1989.
13. Hostettmann K, Marston A. Isolation, purification and characterization of flavonoids. *Prog Clin Biol Res*. 1986; 213: 43-51.
14. Yeh J, Liou S, Liang J, Huang Y, Chiang L, Wu J, et al. Vanidipinedilol: A vanilloid-based  $\beta$ -adrenoceptor blocker displaying calcium entry blocking and vasorelaxant activities. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000; 35: 51-63.
15. Karaky H, Weiss G.B. Alterations in high and low affinity binding of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to lanthanum and low temperature. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979; 211: 86-92.

16. Duarte J, Pérez F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Inhibitory effects of quercetin and staurosporine on phasic contractions in rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1994; 262: 149-56.
17. Morales M, Lozoya X. Calcium antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Med.* 1994; 60: 313-7.
18. Chan E, Pannangpetch P, Woodman O. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 35: 326-33.
19. García L, Guarín D, Tobar M. Obtención de ayanina de las hojas de *Croton glabellus*. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 1986; 15: 95-8.
20. Novoa B, Céspedes A, García L, Olarte J. Quercitrina: un flavonoide con actividad hipotensora obtenido de *Croton glabellus*. *Rev Col Cienc Quím Farm.* 1985; 4: 7-13.
21. Guerrero MF, Carrón R, Martín ML, San Román, L, Reguero MT. Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *J Ethnopharmacol.* 2001; 75: 33-6.
22. Guerrero MF, Puebla P, Martín ML, Carrón R, San Roman L, Reguero MT, Arteaga L. Inhibitory effect of N(G)-nitro-l-arginine methyl ester on the anti-adrenergic response elicited by ayanin in the pithed rat. *Planta Med.* 2002; 68: 322-5.
23. Guerrero MF, Puebla P, Carrón R, Martín ML, San Roman L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54: 1373-8.
24. Puebla P, Lopez JL, Guerrero M, Carrón R, Martín ML, San Roman L, San Feliciano A. Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Phytochemistry.* 2003; 62: 551-5.
25. Puebla P, Correa SX, Guerrero M, Carrón R, San Feliciano A. New cis-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Chem Pharm Bull. (Tokyo)* 2005; 53: 328-9.
26. Formica, JV. Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33: 1061-80.