

Artículo Original

Evaluación de la actividad anti-colagenasa del látex de *Croton lechleri*Evaluation of the anti-collagenase activity of the latex of *Croton lechleri*Lucio Obando ¹, César Fuertes ¹¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú**Resumen**

En los últimos años el interés por la eliminación de las “arrugas” ha motivado a la industria cosmética a realizar investigaciones basadas en plantas medicinales que contenga propiedad antioxidante, anticollagenasa y antielastasa. El *Croton lechleri* “sangre de grado” es una planta que es conocida por su propiedad cicatrizante; sin embargo, esta actividad posiblemente le otorgue la propiedad anti-colagenasa, la cual puede evaluar mediante varios métodos. El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad anti-colagenasa del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado”. Para realizar esta evaluación se utilizó la metodología de Thing, el cual se lleva a cabo, comparando la actividad (absorbancias) que genera el patrón de epigallocatequina con las muestras del látex de *Croton lechleri* a las siguientes concentraciones: 125, 250, 500 y 1000 µg/mL. Al finalizar este método se halló que el látex de *Croton lechleri* presentó actividad anti-colagenasa de IC₅₀ = 908,02 µg/mL, con respecto al control positivo galato de epigallocatequina (EGCG) de IC₅₀ = 1892,03 µg/mL. Esto concluye que el látex de *Croton lechleri* manifiesta la actividad anticollagenasa con mayor potencial de inhibición que el control positivo de EGCG.

Palabras clave: Arrugas; anticollagenasa; concentración; porcentaje de inhibición.

Abstract

In recent years, interest in the elimination of “wrinkles” has motivated the cosmetic industry to carry out research based on medicinal plants that contain antioxidant, anticollagenase and antielastase properties. *Croton lechleri* “blood of degree” is a plant that is known for its healing property; However, this activity may give you the anti-collagenase property, which you can evaluate by several methods. The objective of this work is to evaluate the anti-collagenase activity of *Croton lechleri* latex “blood grade”. To carry out this evaluation, the Thing methodology was used, which is carried out, comparing the activity (absorbances) generated by the epigallocatechin pattern with the *Croton lechleri* latex samples at the following concentrations: 125, 250, 500 and 1000 µg / mL at the end of this method, it was found that *Croton lechleri* latex showed anti-collagenase activity of IC₅₀ = 908.02 µg / mL, with respect to the positive control epigallocatechin gallate (EGCG) of IC₅₀ = 1892.03 µg / mL. This concludes that *Croton lechleri* latex manifests anticollagenase activity with greater inhibition potential than the positive control of EGCG.

Keywords: Wrinkles; anticollagenase; concentration; percent inhibition.

Correspondencia:

Nombre: Lucio Obando Barrera
Correo: lobandoqf@hotmail.com

Recibido: 25/08/2019

Aceptado: 07/11/2019

Citar como:

Obando, L. y Fuertes, C. (2019). Evaluación de la actividad anti-colagenasa del látex de *Croton lechleri*. *Ciencia e Investigación* 2019 22(2):35-40.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercial - Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

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 por exudar una cantidad considerable de látex, la cual posee efecto farmacológico y cosmético⁽²⁾. Una de las propiedades cosméticas con mayor importancia, es la inhibición de la enzima colagenasa que conlleva a la eliminación de las arrugas, las cuales evidencian el envejecimiento. Esto conlleva a que muchísimas personas opten en buscar método que ayuden a la revaloración de la belleza.



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 su acción de regenerar los tejidos, su actividad antioxidante, curar las úlceras, propiedades antidiarreicas, anticancerígenas, antiinflamatorias y antirreumáticas. Además de su propiedad antisépticas a nivel vaginal⁽⁴⁻⁵⁾.

El envejecimiento etario aún persiste en el tiempo. Algunos autores precisan a la vejez como una evolución por etapas, que se va desarrollando de forma inalterable,

propia y natural, que sobrelleva toda la especie viviente, vinculando la genética del ser vivo con su entorno ambiental. Eludir la senectud es el mayor anhelo de la humanidad, en efecto tratarla simboliza un reto científico⁽⁶⁾.

La “sangre de grado” es empleada desde épocas ancestrales y sigue siendo utilizada actualmente porque ha demostrado propiedades medicinales como cicatrizante, antiviral, antiinflamatorio, anticancerígenas⁽⁷⁾ y posiblemente actividad antitumoral⁽⁸⁾, etc. Los metabolitos que posee como la taspina, la 4-0-metilcedrusia, 3-4-0-dimetilcedrusina⁽⁹⁾ y el principio SP-303 y la proantocianidina oligomérica⁽¹⁰⁻¹¹⁾, son algunos de los responsables para tratar las 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⁾.

Los últimos años el interés por la eliminación de las “arrugas” o el deterioro del colágeno ha motivado a la industria cosmética para realizar investigaciones basadas en plantas medicinales que contengan propiedades antioxidante, anticolagenasa y antielastasa⁽¹³⁾; por consiguiente, la evaluación del látex *Croton lechleri* pretende evidenciar la actividad anticolagenasa y que esta sea usada de manera adecuada mediante preparados cosméticos como lociones y cremas y contribuir hacia el desarrollo de la industria de ingredientes naturales y de fitocosméticos a base de plantas de la biodiversidad peruana.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación es analítica y transversal.

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.s.n.m. y a 3° 45’ de latitud sur. La muestra botánica fue identificada por el Blgo. José Campos De La Cruz y transportada en condiciones adecuadas de refrigeración, mediante vía aérea.

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. Tomando 1mL de muestra, diluyéndolo en 10 a 100mL de cada solvente. Además se realizó el estudio fitoquímico del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado”, evaluando la presencia de carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides, aminoácidos y antocianinas.

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 ensayos, 100 µL del látex de *Croton lechleri* (a concentraciones de 125; 250; 500 y 1000 mg/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 minutos 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 minutos 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 fueron ejecutados tres veces.

La fórmula utilizada fue la siguiente:

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

Donde:

Abs_c = Absorbancia del placebo

Abs_s = Abs. del compuesto con sustrato – Abs. del compuesto sin sustrato

Las EC₅₀ (Concentración efectiva media) se cuantificó por análisis de regresión lineal, La abscisa representa las concentraciones del látex de *Croton lechleri* y la ordenada 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≤0,05).

RESULTADOS

Solubilidad

- Moderadamente soluble en agua
- Soluble en alcohol
- Moderadamente soluble en propilenglicol

Marcha Fitoquímica (Ver Tabla 1)

Inhibición de la Enzima Colagenasa (Ver Tabla 2)

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

REACCIÓN	METABOLITO SECUNDARIO	CARACTERÍSTICA POSITIVA	CALIFICACIÓN
MOLISH	CARBOHIDRATOS	Anillo color violeta	++
FEHLING	CARBOHIDRATOS	Precipitado rojo	+++
FeCl ₃	COMPUESTOS FENÓLICOS	Precipitado verde azulado	+++
GELATINA	TANINOS	Precipitado blanquecino	++
BORTRANGER	ANTRAQUINONAS	Coloración rojiza	++
SHINODA	FLAVONOIDES	Coloración diversa (amarillo-naranja)	++
REACCIÓN AFROSIMETRICA.	SAPONINAS	Formación de espuma, mayor a 1 cm, que dura más de 10 min.	+++
DRAGENDORFT	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 (-)

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

Látex de <i>Croton lechleri</i> (µg/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

IC₅₀ (µg/mL) = 908,02 µg/mL

Absorbancia: 348 nm.

Análisis Estadístico. El porcentaje de inhibición en la columna de la muestra indican diferencia significativa entre las medias usando el método Anova, con un nivel de confianza al 95 %. ($p \leq 0,05$) (Ver Tabla 3).

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”, la cual se conoce que se utiliza en la amazonia 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 rescatar que la administración de *Croton lechleri* no ha generado toxicidad en ratones a nivel hematológico y bioquímico¹⁶.

La actividad anticolagenasa del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado”, 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 $IC_{50} = 908,02 \mu\text{g/mL}$ para el látex de *Croton lechleri*, que comparado con el $IC_{50} = 1892,03 \mu\text{g/mL}$ del compuesto de referencia de

muestran 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 colganeasa, comparada con la investigación realizada a la *Caesalpinia spinosa* “tara”, que elaboraron Núñez y Quispe (2017), la cual indica 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). Obteniéndose 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: $IC_{50} 1892,03 \mu\text{g/mL}$.

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				

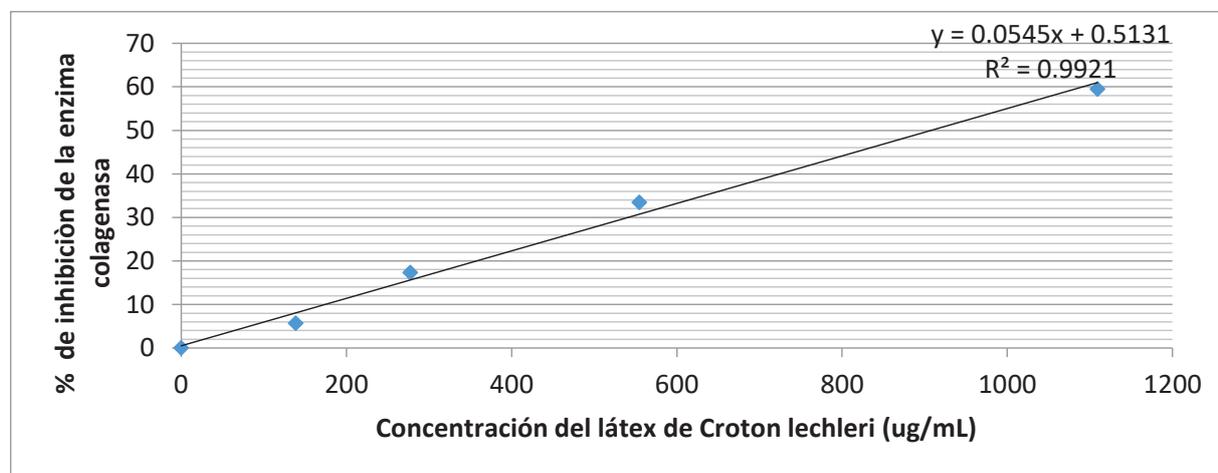


Figura 2. Correlación entre la concentración del látex de *Croton lechleri* vs % de inhibición de la enzima colagenasa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salatino A, Faria M, Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). Sociedade Brasileira de Química. 2007; 18(1): 11-33. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
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, Huáman 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. <https://doi.org/10.15381/anales.v67i3.1300>
4. Gupta D, Gupta R, Bleakley B, Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutics uses. 2008; 115(3): 361-80. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.018>
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. <https://doi.org/10.15381/anales.v71i2.78>
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. <https://doi.org/10.4321/s2340-98942015000400001>
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 anti-genotóxicos de la savia de *Croton dracooides*. Facultad de Medicina - UMSA. 2000; 8: 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, Huáman 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. <https://doi.org/10.15381/anales.v66i2.1359>
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. <https://doi.org/10.4321/s0376-78922008000100003>
14. Cevallos D, Jaramillo C, Cuesta O, Garcia G, Rojas L. Composición química, actividad cicatrizante y toxicidad del látex de *Croton lechleri*. Revista científica-Universidad del Zulia. Venezuela. 2016; 26(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. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-27>
16. Betancur J, Rios 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. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2017.21.40>

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuente de financiamiento: autofinanciada.

