

Estudio del efecto inhibitorio de extractos de *Salvia scutellarioides* sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina

Raúl Arenas-Carvajal²; Erica Pachón-Gómez²; Gina Méndez-Callejas^{1*}; Antonio Guzmán-Avendaño²

¹Pontificia Universidad Javeriana, carrera 7ª. No. 43-82, Bogotá, Colombia

²Universidad Distrital Francisco José de Caldas

* g.mendez@javeriana.edu.co

Recibido: 08-04-2008; Aceptado: 24-11-2009

Resumen

Objetivo. Identificar los grupos de metabolitos secundarios de la *Salvia scutellarioides* presentes en la fracción que presenta un mayor efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). **Materiales y métodos.** Se empleó material vegetal seco con el que inicialmente se prepararon extractos etanólicos, luego estos se concentraron y se separaron por cromatografía en columna en diferentes polaridades (éter de petróleo, diclorometano, éter etílico y etanol). Posteriormente se aisló tejido pulmonar de ratas Wistar, el cual fue disgregado y sometido a centrifugación para separar el material soluble. Se separaron las proteínas encontradas en el sobrenadante empleando una columna de Sephacryl; se realizó un pool con las fracciones que presentaron actividad frente al sustrato de la ACE Hippuryl-L-histidyl-L-leucine. Con este extracto enzimático fue posible medir el efecto de los extractos vegetales obtenidos de la *Salvia scutellarioides* sobre la actividad de la ACE. **Resultados.** La fracción de acetato de etilo (T2) fue la que mostró un mayor efecto inhibitorio sobre la actividad de la ACE. Los metabolitos encontrados en la fracción de T2 fueron: taninos, glicosidos cardiotónicos, cumarinas y quinonas. **Conclusión.** Se determinó el efecto antihipertensivo para la especie en estudio, por medio de la inhibición de la actividad de la ACE; de igual manera se identificaron varios grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto de T2 que podrían ser los responsables de tal efecto.

Palabras clave: actividad enzimática, angiotensina II, enzima convertidora de angiotensina, Hipertensión arterial, *Salvia scutellarioides*.

Abstract

Study of the inhibitory effect of *Salvia scutellarioides* extracts on the activity of the angiotensin-converting enzyme. Objective. To identify groups of secondary metabolites of *Salvia scutellarioides* present in the fraction with the greatest inhibitory effect on the activity of the angiotensin-converting enzyme (ACE). **Materials and methods.** Dry plant material was used to prepare ethanolic extracts that were then concentrated and separated by column chromatography using solvents of different polarity (petroleum ether, dichloromethane, diethyl ether and ethanol). Subsequently, lung tissue isolated from Wistar rats was broken and centrifuged in order to separate the soluble material. Proteins found in the supernatant were separated using a Sephacryl column; a pool was made with the fractions that showed activity with hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL), the substrate of the ACE. This enzyme extract was used to measure the effect of plant extracts obtained from *S. scutellarioides* on the ACE activity. **Results:** The fraction of ethyl acetate (T2) showed a greater inhibitory effect on the ACE activity. Metabolites found in T2 fraction were: tannins, cardiac glycosides, coumarins, and quinones. **Conclusion.** An antihypertensive effect was found for the plant species *Salvia scutellarioides* by studying the inhibitory effect on the ACE activity. Several groups of secondary metabolites present in the T2 fraction were identified, which could be responsible for this effect.

Key words: angiotensin II, angiotensin-converting enzyme, arterial hypertension, enzymatic activity, *Salvia scutellarioides*.

Resumo

Estudo do efeito inibitório de extratos de *Salvia scutellarioides* sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina. Objetivo. Identificar os grupos de metabólitos secundários de *Salvia scutellarioides* presentes na fração que tem um maior efeito inibitório sobre a atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA). **Materiais e métodos.** Foi utilizado material vegetal seco com o qual inicialmente prepararam-se os extratos etanólicos, depois, estes se concentraram e foram separados por cromatografia em coluna em diferentes polaridades (éter de petróleo, diclorometano, éter etílico e etanol). Posteriormente, foi isolado tecido pulmonar de ratos Wistar, o qual foi desagregado e centrifugado para separar o material solúvel. Foram separadas as proteínas presentes no sobrenadante utilizando uma coluna de Sephacryl; realizou-se um pool com as frações que apresentaram atividade contra o substrato da ACE Hippuril-L-histidil-L-leucine. Com este extrato enzimático foi possível medir o efeito de extratos vegetais obtidos da *Salvia scutellarioides* sobre a atividade da ACE. **Resultados.** A fração de acetato de etilo (T2) foi a que apresentou maior efeito inibitório na atividade da ACE. Os metabólitos encontrados na fração do T2 foram: taninos, glicosídeos cardiotônicos, cumarinas e quinonas. **Conclusão.** Foi determinado o efeito anti-hipertensivo para a espécie em estudo, através da inibição da atividade da ACE, também foram identificados vários grupos de metabólitos secundários presentes no extrato de T2 que poderiam ser responsáveis por este efeito.

Palavras-chave: atividade enzimática, angiotensina II, enzima conversora de angiotensina, Hipertensão arterial, *Salvia scutellarioides*.

Introducción

La hipertensión arterial (HA) es una de las enfermedades más importantes y frecuentes entre la población mundial y que genera altos costos por su alta prevalencia, su cronicidad, su gran dependencia de la farmacoterapia múltiple y sus complicaciones, con frecuencia de carácter letal (1). En países en desarrollo como Colombia, según las últimas estadísticas de la Organización Panamericana de la Salud, la prevalencia de la hipertensión entre la población mayor de 15 años es de 12,6% y esta enfermedad constituye el primer factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, las cuales son la segunda causa de muerte en hombres y mujeres mayores de 45 años (2).

En la visión fisiopatológica actual de la enfermedad, esta es considerada como un trastorno multifactorial con un importante componente genético (3). Hasta el momento, los principales factores involucrados en la génesis de la hipertensión incluyen entre otros, la hiperproducción de hormonas y moléculas inductoras de la retención de sodio, entre ellas el óxido nítrico; la endotelina 1; el tromboxano A₂; la prostaciclina; la noradrenalina y la angiotensina II (AII) (4).

La angiotensina II (AII) es producida por modificación de la angiotensina I mediante una reacción catalizada por la enzima convertidora de angiotensina (ACE), una enzima que hace parte del sistema renina – angiotensina y que ejerce su acción principalmente en el tejido pulmonar. AII estimula la producción de aldosterona, lo que produce la reabsorción de agua y sodio por los túbulos renales para que sea devuelta a la sangre, elevando la concentración en el medio extracelular, y al mismo tiempo, elevando el volumen de sangre por minuto. Esta retención de sodio y de agua, y el incremento del volumen de sangre, tiene como resultado un

aumento en la tensión arterial; de esta manera la inhibición de la ACE reduce los niveles circulantes de AII y por lo tanto la presión arterial y la vasoconstricción (5).

Los inhibidores de la ACE (IACE), se han establecido como medicamentos útiles, solos o en combinación con otros fármacos, en el tratamiento de la hipertensión arterial sistémica y la insuficiencia cardiaca congestiva (6). Un medicamento del grupo de (IACE), generalmente actúa ligando el zinc, cofactor de la ACE, a un grupo sulfhidrilo, lo que permite bloquear eficazmente los lugares activos de la enzima e inhibir así, su actividad biológica. No obstante estas ventajas de los inhibidores de la ACE pueden resultar inefectivas en el momento que produzcan efectos adversos tales como erupciones o sarpullidos en la piel, trastornos alimenticios y tos entre otros, que obligan a interrumpir el tratamiento (7). Debido a los efectos adversos de los IACE, y a partir de los resultados mostrados por estudios sobre productos naturales, se propone la utilización de plantas medicinales como alternativa en el tratamiento de la HA. A partir de este hecho, se ha logrado identificar péptidos bioactivos presentes en el frijol y el arroz que inhiben la actividad de la ACE y por lo tanto disminuyen la presión sanguínea mostrando descensos en la hipertensión arterial, sin mostrar efectos secundarios en ratas y humanos (8). En Colombia el género de las Salvias, familia *Lamiaceae*, posee una gran diversidad de compuestos a los cuales se les atribuye sus propiedades medicinales, entre ellos están los flavonoides; mono, di y triterpenos; sesquiterpenos; taninos condensados; aceites esenciales; lignanos; ácidos fenólicos; entre otra serie de compuestos, que han demostrado poseer un aparente efecto sobre las funciones cardiovasculares y otras entidades patológicas (9-13). La especie *Salvia scutellarioides*, ha mostrado poseer un efecto sobre la presión arterial; este efecto fue analizado mediante un estudio *in vivo* en ratas hipertensas,

donde se encontró que las infusiones acuosas de la planta disminuían la presión arterial y promovían una regresión en la enfermedad (13)

A partir de los estudios previos, se propuso un análisis de la actividad enzimática de la ACE en presencia de los metabolitos que se encuentran en extractos de *Salvia scutellarioides*, con el fin de establecer cuales grupos de metabolitos pueden ser los principios activos que tienen un efecto antihipertensivo con el fin de avanzar en la búsqueda de productos naturales eficaces para el tratamiento de dicha enfermedad.

Materiales y métodos

Material vegetal y preparación de extractos

se seleccionó la especie *Salvia scutellarioides*, una planta semirastrera, conocida por sus propiedades antihipertensivas y que puede ser encontrada en casi todas las regiones del país. Para el presente estudio se recolectó muestras vegetales de la región del Tequendama, departamento de Cundinamarca – Colombia; y se llevo para su respectiva identificación al Herbario Nacional de Colombia (H.N.C.), donde se le asignó el número de identificación Col 515971.

Para la preparación del extracto inicial, se realizó por separado una maceración de 203,5g de tallos y 149,5g de hojas secas de la *Salvia scutellarioides* y se empleó como agente de disolución etanol al 96%. Se tomaron alícuotas de 500 mL de cada uno de los extractos a los que se les realizó una limpieza con carbón activado y luego una rotaevaporación para la concentración del licor, hasta una consistencia semisólida. Una vez concentrados los extractos se realizó un fraccionamiento en columna, con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y etanol) (14).

Extracción y separación parcial de la ACE

Se emplearon los pulmones de 15 ratas Wistar de 2 meses de edad, mantenidas en las condiciones apropiadas del bioterio para ratas: humedad relativa entre 40 y 70%; temperatura entre 20 – 22°C; luz artificial de tubos fluorescentes con una intensidad de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con alimentación *ad libitum*. Las ratas fueron anestesiadas con 1,0ml de Nembutal, posteriormente fue abierta la cavidad torácica para realizar una perfusión en la vía de la arteria pulmonar con solución salina al 0,95%, luego fueron retirados los pulmones y almacenados en buffer fosfato de sodio 0,02M pH 8,3 y 4°C. Se realizó una disgregación del tejido pulmonar en

un homogenizador “VIRTIS 23”, a una velocidad de 100rpm, durante una hora en un baño de hielo a 4°C controlado con termómetro; después se realizó una separación del material soluble en una centrifuga “BECKMAN L-70” 70Ti a una velocidad de 850 xg por 45min a 4°C, se descartó el precipitado y se siguió el proceso con el sobrenadante. Se realizó una separación parcial de las proteínas encontradas en el sobrenadante empleando una columna de Sephacryl S-200 (SIGMA) empleando como fase móvil buffer fosfato 0,02M pH 8,3 (15). Luego de realizar la separación se obtuvieron diferentes fracciones y su absorbancia fue leída en un espectrofotómetro SmartSpect™ 3000 BioRad™ a una longitud de onda de 280nm. Se realizó la determinación de la actividad enzimática a cada una de las fracciones y se realizó un pool con las fracciones que mostraron tal actividad frente a Hippuril-L-histidyl-L-leucine a una concentración de 0,2% p/v.

Determinación de la actividad enzimática de la ACE

Para los ensayos de actividad enzimática se empleó el procedimiento sugerido por Cushman and Cheung (16), tomando en cuenta algunas consideraciones realizadas por Wang, Saito, Tatsumi and Li (17). El proceso realizado se describe a continuación: Se midió la actividad de 0,05mL de la ACE frente a su sustrato, Hippuril-L-histidyl-L-leucine (SIGMA) en diferentes concentraciones %p/v: 0,15%, 0,20%, 0,25% y 0,30%. Bajo las mismas condiciones se realizó la medición de la actividad de la ACE adicionando enalapril (SIGMA), a una concentración de 0,4% p/v como control positivo, teniendo en cuenta que se emplea como medicamento para inhibir la actividad de la ACE en pacientes hipertensos. De la misma manera, se evaluó la propiedad inhibitoria en cada uno de los extractos obtenidos de la *Salvia scutellarioides* tanto para tallos como para hojas. La concentración de cada uno de los extractos fue de 0,2% p/v en PBS en todos los ensayos. Durante el procedimiento se realizó una incubación por 30 minutos de la enzima con su sustrato y según era el caso con los inhibidores; la reacción fue detenida con 0,25ml de HCl 1M. Posteriormente se realizó una extracción del producto de la actividad enzimática con 1,0ml de acetato de etilo, seguido de la evaporación del exceso de acetato de etilo; este producto se solubilizó en 1,5ml de agua. Se determinó la absorbancia del producto obtenido a una longitud de onda de 228nm en una celda de 1cm.

El procedimiento fue realizado cinco veces, lo que permitió realizar un análisis estadístico donde se determinó la variación de los datos con respecto de los promedios obtenidos. Posteriormente se construyeron gráficas de actividad enzimática expresada en unidades de la enzima por

mililitro de proteína total. Una unidad se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de Hip-L-His-L-Leu por minuto a una temperatura de 37°C. Para este cálculo se relacionaron las absorbancias obtenidas en presencia de los extractos y en ausencia de ellos (blanco), el factor de conversión desde que el HA es detectado en la mitad del volumen total del ensayo, el total de HA en la solución, el coeficiente de extinción molar equivalente a 9,8, el tiempo de incubación y el volumen de enzima utilizado en el ensayo.

Posteriormente se calcularon los porcentajes de inhibición relacionando los datos de las unidades de enzima producidas para cada concentración de sustrato con respecto de la reacción en presencia del control, de la reacción en presencia de las muestras y del blanco (**Formula 1**).

$$\%Inh = \frac{\frac{Ue}{mL} S - \frac{Ue}{mL} X}{\frac{Ue}{mL} S} \times 100 \quad [1]$$

Donde: %Inh es el porcentaje de inhibición, Ue/mL S, son las unidades de enzima producidas por mililitro para solo la actividad con el sustrato, Ue/mL X, es las unidades de enzima producidas por mililitro para las diferentes muestras de inhibidor; incluido el control positivo (enalapril).

Análisis fitoquímico cualitativo

Se efectuó una identificación de los grupos de metabolitos secundarios a las fracciones que presentaron actividad inhibitoria. Se emplearon para este análisis las pruebas cualitativas descritas por Bilbao (14).

Resultados

Aislamiento de la ACE

La cromatografía de filtración en gel realizada fue una técnica útil para la separación parcial de las proteínas solubles presentes en el tejido pulmonar, lo cual se evidencia en el cromatograma de las fracciones obtenidas (**Figura 1**). Para identificar las fracciones que contenían la ACE se realizó la evaluación de la actividad enzimática en cada una de ellas, encontrando actividad en las fracciones 27 a 31 (**Figura 2**). Se obtuvieron 7,5mL del pool de tales fracciones, que resultó en una concentración de 0.8mg/mL y 0,31 Unidades/ml de proteína por minuto.

Actividad enzimática de la ACE

Diferentes extractos de la *Salvia scutellarioides* mostraron tener un efecto inhibitorio de la actividad de la ACE. En la figura 3 se presentan las curvas de actividad enzimática.

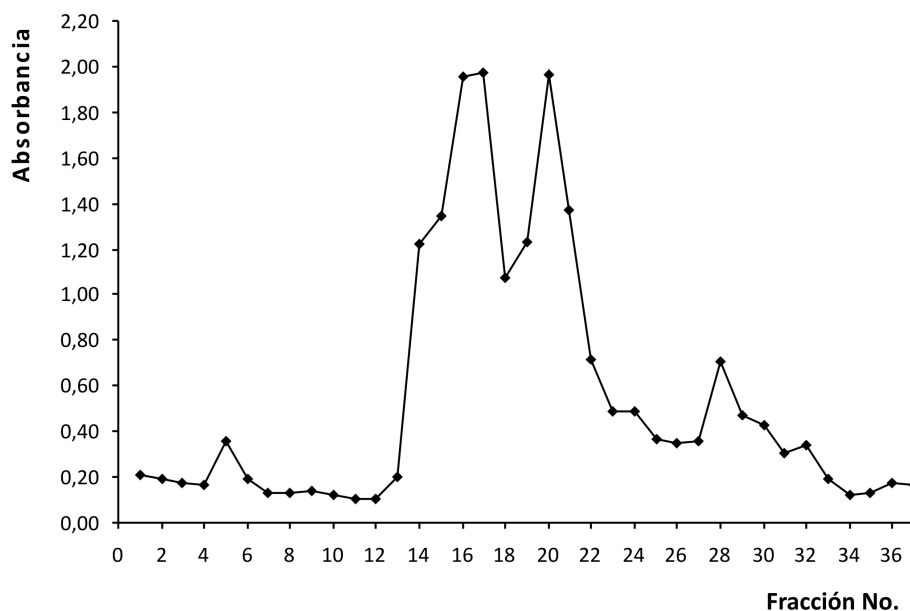


Figura 1. Cromatograma de filtración en gel en Sephacryl S-200.

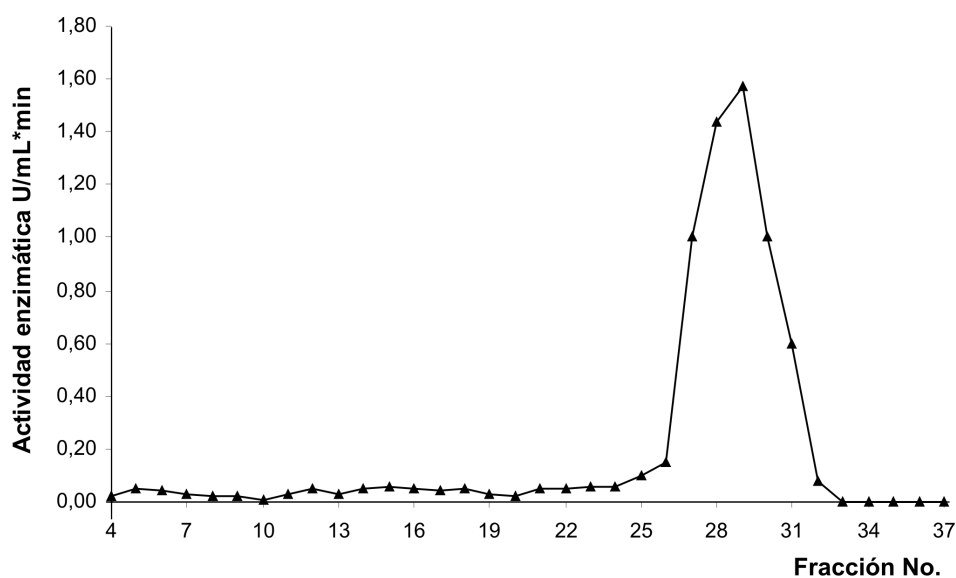


Figura 2. Determinación de la actividad enzimática de las fracciones proteicas frente al sustrato Hippuril-L-histidyl-L-leucine.

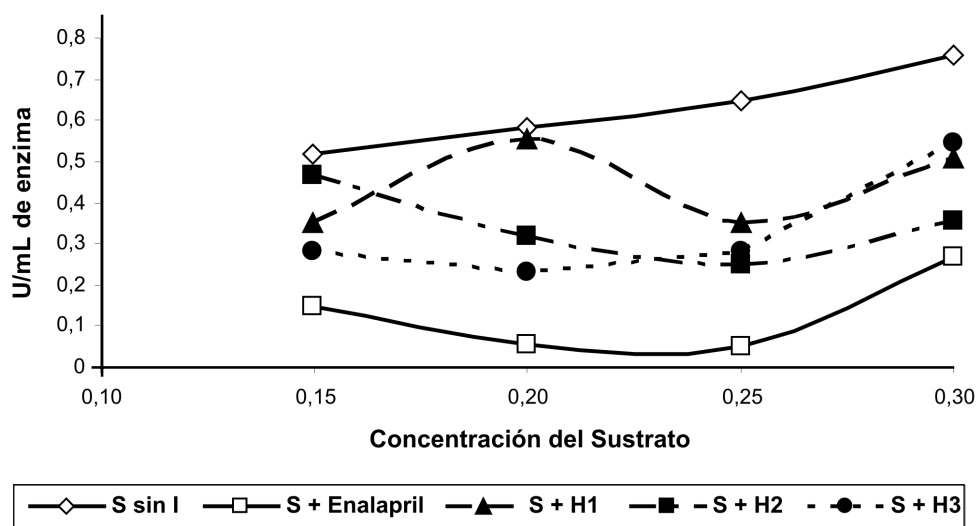


Figura 3. Determinación de la actividad enzimática de la ACE, frente a su sustrato y la adición de los extractos de las hojas (H), de *Salvia scutellarioides* (S: sustrato de la enzima (HHL); I: inhibidor control (enalapril); H1: extracto etanólico; H2: extracto en acetato de etilo; H3: extracto en diclorometano).

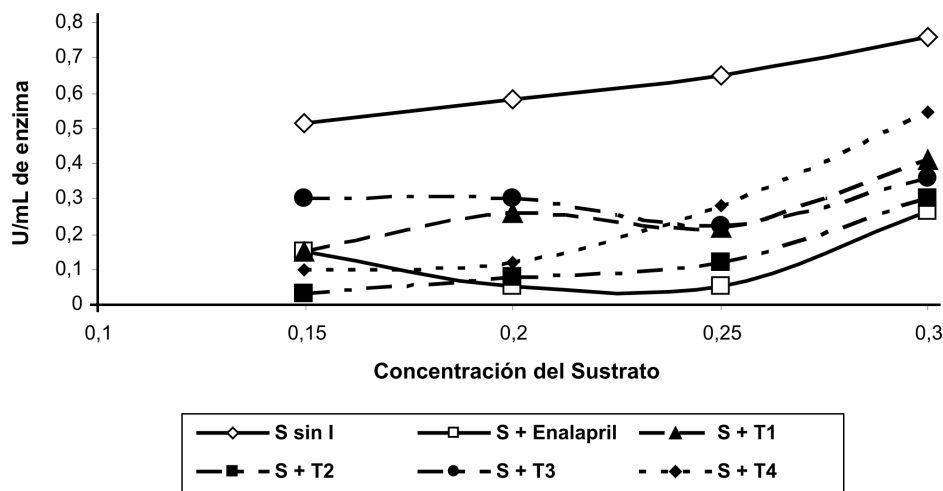


Figura 4. Determinación de la actividad enzimática de la ACE, frente a su sustrato y la adición de los extractos de los tallos (T), de *Salvia scutellarioides* (S: sustrato de la enzima (HHL); I: inhibidor control (enalapril); T1: extracto etanólico; T2: extracto en acetato de etilo; T3: extracto en diclorometano; T4: extracto en éter de petróleo).

tica de la ACE frente a su sustrato, el control positivo para la inhibición, y los tres extractos de hojas obtenidos: etanólico, en acetato de etilo y en diclorometano. En la figura 4, se presentan los resultados bajo las mismas condiciones pero cambiando los extractos de hojas por los cuatro extractos obtenidos de los tallos correspondientes al extracto etanólico, en acetato de etilo, en diclorometano y en éter de petróleo.

Para tener una idea más clara del efecto de los diferentes extractos evaluados, frente a la actividad de la ACE se calcularon los porcentajes de inhibición (Tablas 1, 2); y los valores máximos y mínimos que han sido los intervalos tenidos en cuenta (Tabla 3).

Análisis cualitativo de los extractos con efecto inhibitorio

En la tabla 4 se exponen las pruebas fitoquímicas de identificación de los grupos de metabolitos secundarios que fueron realizadas al extracto de tallos T2: en acetato de etilo ya que presentó el mayor porcentaje de inhibición en las diferentes concentraciones del sustrato en comparación con los demás extractos; esto se evidencia en el menor grado de variación de los datos donde el intervalo se encuentra entre 68,27% y 92,97% de inhibición; con respecto al control positivo (enalapril) con valores entre 67,8% y 91,58% de inhibición.

Tabla 1. Porcentajes de inhibición (%I) de la ACE frente a su sustrato y en presencia de los extractos de hojas de *Salvia scutellarioides*.

[Sustrato]	% I: S+Icontrol	% I: S+H1	% I: S+H2	% I: S+H3
0,15	71,22	32,15	9,57	45,72
0,20	90,75	4,93	44,99	60,46
0,25	91,96	45,89	61,35	56,71
0,30	64,84	33,10	52,98	28,50
PROMEDIO	79,69	29,02	42,22	47,85
DESVEST	11,89	14,92	19,72	12,42

Tabla 2. Porcentajes de inhibición (%I) de la ACE frente al sustrato (S) y en presencia de los extractos de tallos de *Salvia scutellarioides*

[Sustrato]	% I: S+Icontrol	% I: S+T1	% I: S+T2	% I: S+T3	% I: S+T4
0,15	71,22	70,92	93,80	41,84	80,61
0,20	90,75	55,31	86,25	48,43	79,37
0,25	91,96	65,99	81,90	65,81	56,71
0,30	64,84	46,31	60,54	52,57	28,02
PROMEDIO	79,69	59,63	80,62	52,16	61,18
DESVEST	11,89	9,54	12,35	8,76	21,38

Tabla 3. Valores máximos y mínimos para los análisis de los porcentajes de inhibición

	Mínimo	Máximo
S+I Control	67,8	91,58
S+H1	14,1	43,94
S+H2	22,5	61,94
S+H3	35,43	60,27
S+T1	50,09	69,17
S+T2	68,27	92,97
S+T3	43,4	60,92
S+T4	39,8	82,56

Discusión

Salvia scutellarioides, es una planta medicinal empleada entre la población campesina de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá para contrarrestar los problemas de hipertensión. El estudio desarrollado, nos da una idea de los posibles principios activos de la planta, responsables de los efectos antihipertensivos que menciona la comunidad.

En general los datos nos muestran unos resultados de evidentes inhibiciones de la actividad enzimática de la ACE, además de presentar diferencias en cuanto a la composición del tipo de metabolitos presentes en cada una de las fracciones analizadas, a partir de lo cual el trabajo se centró en la identificación de la fracción que tuviera un mayor efecto sobre la actividad de la ACE y sobre esta realizar una identificación cualitativa de grupos de metabolitos presentes. La evaluación de la actividad de la ACE *in vitro*, fue determinante para la identificación de la fracción que contiene los grupos de metabolitos que actúan como inhibidores de tal actividad.

La cromatografía de filtración en gel realizada demostró ser una técnica útil para obtener extractos proteicos sin afectar la actividad enzimática, lo que permitió realizar las pruebas de evaluación del efecto inhibitorio de los grupos de metabolitos presentes en los extractos con diferente polaridad de hojas y tallos. Las pruebas de actividad de las fracciones obtenidas en la cromatografía (**Figura 2**), permitieron identificar de una manera efectiva la ACE, y la separación de esta enzima de la hemoglobina, una proteína de mayor peso molecular y que por su coloración característica debida al grupo hemo, podría de alguna manera interferir en la detección espectrofotométrica realizada.

De esta manera las fracciones 27 a 31, fueron mezcladas en un pool y fue determinada su concentración y actividad para establecer las unidades por mililitro de proteína total presente en el pool. Con los valores ya establecidos y la cantidad de enzima parcialmente aislada, fue posible realizar el protocolo de determinación de actividad enzimática e inhibitoria de la ACE frente a los extractos de la *S. scutellarioides*.

Durante la reacción hidrolítica catalizada por la ACE aislada del pulmón de rata adulta, fue posible producir HA a partir de HHL, siendo mayor esta cantidad de producto a medida que se incrementa la concentración de sustrato en la reacción tomada como blanco (**Figuras 3 y 4**) y una tendencia a disminuir, en presencia de los diferentes extractos de *S. scutellarioides*. A partir de las curvas que resultaron de las determinaciones enzimáticas (**Figuras 3 y 4**), y los datos de porcentajes de inhibición (**Tablas 1 y 2**), es posible afirmar que si hay principios activos presentes en la *Salvia scutellarioides* que poseen un efecto inhibitorio sobre la ACE; pero la tendencia que se muestra no es constante, pues se esperaba que a medida que se aumentara la concentración del inhibidor la actividad de la enzima disminuyera, lo que significa que para la búsqueda de la aplicación de estos extractos en el campo medicinal es importante realizar una estandarización de la concentración del inhibidor en la que se observe el mayor efecto sobre la actividad de la enzima. Por otra parte, fue posible comparar el efecto de los metabolitos de hojas y de tallos, encontrando que los de tallos que tienen un mayor efecto inhibitorio, y especialmente los que se encuentran en el extracto de acetato de etilo, de acuerdo con los porcentajes de inhibición obtenidos (**Tabla 2**), y con la baja producción de HA (**Figura 4**). La inhibición de la ACE es evidente en presencia de estos metabolitos solubles en acetato de etilo, incluso tienen más efecto que el medicamento sintético empleado como control (**Tabla 2**).

El extracto de los tallos en éter de petróleo también mostró un promedio alto de porcentaje de inhibición (**Tabla 2**) y una baja estabilidad de los resultados en diferentes concentraciones del sustrato. De la misma manera los extractos de hojas no solo presentaron bajo porcentaje de inhibición sino también una alta variación de los datos a diferentes concentraciones del sustrato, lo que posiblemente podría interferir en la utilidad de los metabolitos, como inhibidores naturales de la ACE.

De esta manera, alguno de los componentes del extracto de acetato de etilo, podría ser efectivo como medicamento natural para la hipertensión. Es así como en una primera aproximación, el análisis fitoquímico cualitativo nos proporciona una idea de los grupos de metabolitos que posiblemente actúen como principios activos que afectan la actividad de la ACE, encontrando que dentro de este extracto hay presencia de taninos, glicósidos cardiotónicos, cumarinas y quinonas (**Tabla 3**). Estos metabolitos no coinciden con los propuestos en un estudio previo (13), donde se emplearon las infusiones de hojas y tallos de *S. scutellarioides* en ratas hipertensas, y se propone que moléculas encontradas en otras especies de la familia Lamiaceae, como alcaloides, triterpenos, lignanos y

flavonoides, además de otras sustancias vasodilatadores como el ácido metiripariocromeno (AMA), sean las posibles responsables de la inhibición de la ACE. Entre los grupos de metabolitos encontrados en el extracto inhibidor de la actividad de la ACE, los taninos podrían ser uno de los principales responsables de alterar tal actividad enzimática, puesto que gracias a su estructura polifenólica es factible la unión con este tipo de proteínas, lo que alteraría su función, tras la aglutinación.

Para establecer de manera precisa el mecanismo de acción inhibitoria de los principios activos de estos extractos sobre la enzima, es necesario avanzar en su purificación y caracterización pues los extractos no tenían una clara tendencia a disminuir a medida que aumentaba la concentración de sustrato, siendo complicado un análisis de la cinética por los métodos convencionales. De la misma manera es importante combinar el estudio experimental con predicciones teóricas que nos podrían mostrar si los metabolitos responsables de la disminución de la actividad bloquean el lugar activo de la enzima, en el que se encuentra un átomo de zinc reconocido según la literatura, como esencial para su actividad biológica (18). Este ion parece tener la propiedad de asociarse con macromoléculas participando de esta manera en la flexibilidad de la coordinación geométrica de la enzima (19).

Otra posibilidad, es la interacción de la molécula con un lugar diferente al sitio catalítico de la ACE, lo cual ratificaría sus propiedades alostéricas mencionadas por algunos autores (20,21). De esta manera se vería afectada la conformación de la proteína impidiendo su efectiva interacción con el sustrato HHL.

Los resultados obtenidos en este estudio son la base para la formulación de nuevos trabajos de investigación a nivel teórico, químico y biológico, que definan específicamente la estructura de los metabolitos que actúan como principios activos para la hipertensión arterial y su posible mecanismo de interacción con la enzima para entender de qué manera se lleva a cabo su efecto inhibitorio, paralelamente con estudios *in vivo* de su incidencia en la actividad biológica de la enzima y las células donde realiza su acción catalítica.

Conclusiones

Mediante el mecanismo de inhibición de la actividad de la ACE se comprobó que los diferentes extractos de la *S. scutellarioides* interrumpen la producción de angiotensina II (AII), lo que permite confirmar el efecto antihipertensivo que ha sido sugerido para la especie vegetal

Dentro de estos extractos está la fracción de acetato de etilo de tallos en la que se identificaron varios grupos de metabolitos secundarios que pueden ser los responsables del efecto antihipertensivo. Entre ellos un grupo muy importante, los taninos, que por su estructura pueden unirse fácilmente a proteínas alterando su estabilidad.

Los diferentes estudios realizados desde la medicina tradicional, en los que se afirmaba que las infusiones acuosas de la especie vegetal *S. scutellarioides* disminuían la presión arterial y promovían una regresión en la enfermedad, coinciden con los resultados obtenidos en este estudio que aporta además datos fitoquímicos preliminares sobre los posibles metabolitos responsables de tal efecto antihipertensivo. De esta manera se da paso al diseño de estudios específicos que se enfocarían hacia la caracterización química de los principios activos con miras hacia la obtención de un nuevo grupo de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad.

Agradecimientos

Se agradece al Proyecto Curricular de Licenciatura en Química de la Universidad Distrital, al grupo de Síntesis orgánica de la misma universidad por permitir el uso de su espacio físico para realizar las pruebas fitoquímicas. Así mismo agradecemos al Departamento de Nutrición y Bioquímica de la Universidad Javeriana por facilitar los medios para realizar la determinación de la actividad enzimática.

Financiación

Proyecto Curricular de Licenciatura en Química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses con relación a este trabajo

Referencias

- Martínez E., La actividad física en el control de la hipertensión arterial. *Iatreia* 2000; **13**, (4): 230-236
- Serpa F., Datos históricos sobre la hipertensión arterial. Medicina y humanidades. http://www.medilegis.com/BancoConocimiento/T/Tribuna10MyH_p39-42/Medicinayhumanidades.htm. Consultado el 20 de Noviembre de 2007.
- Barrera E, Cerón N, Ariza MC. Conocimientos y factores de riesgo cardiovascular y su relación con la presencia de hipertensión arterial. *Colombia médica*. 2000; **31**: 20-22.
- Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V, Harper *Bioquímica Ilustrada*. Decimosexta edición en español. Editorial El Manual Moderno. México. 2004, 713p
- Gómez SI, Piccione EA, Feldstein CA, Romero JC, Las "respuestas lentas" a la angiotensina II, la activación de la proteína Src y del factor de crecimiento epidérmico en la génesis de la hipertensión esencial., *Revista Argentina de Cardiología* 2005; **73** (6): 457-461.
- García Barreto D y Toruncha Chuckram A. Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular* 1997; **11** (1): 29-46
- García Barreto D, Hernández Cañero A. Antagonistas de la angiotensina II., Instituto de cardiología y cirugía cardiovascular., *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular* 1999; **13** (2): 155 - 166.
- Guang-Hong Li, Huan Liu, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le. Direct spectrophotometric measurement of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005; **37** (2): 219-224
- Ai-Li J, Chang-Hai W. Antioxidant properties of natural components from *Salvia Plebeia* on oxidative stability of ascidian oil. *Process Biochemistry* 2006, **41** (5): 1111-1116
- Longaray A, Moschen-Pistorello I, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia Officinalis* L. and *Salvia Triloba* L. cultivated in south Brazil., *Food Chemistry* 2005; **100** (2): 603-608.
- Kúzma I, Rózalski M, Walencka E, Rózalska B, Wysokinska H, Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia Sclarea* L. *Salvipisone* as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci* *Phytomedicine* 2007; **14** (1): 31-35.
- Tepe B, Eminagaoglu O, Akpulat AH, Aydin E. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.), *Food Chemistry* 2007; **100** (3): 985 - 989.
- Ramírez J, Palácios M, Gutierrez O. Efecto diurético de la especie *Salvia scutellarioides* en ratas. *Biomédica* 2006; **26**: 145-9

14. Bilbao MR, *Análisis Fitoquímico Preliminar, Química de Productos Naturales*. Editorial Universidad del Quindío., Armenia-Colombia. 1997, 183p.
15. Lanzillo J and Wanbueg BI. Membrane-bound Angiotensin- converting Enzyme from Rat Lung, *Journal of Biological Chemistry* 1974, **249** (7): 2312-2318.
16. Groff J, Harp J, DiGirolamo M. Simplified Enzymatic Assay of Angiotensin-Converting Enzyme in Serum. *Clinical Chemistry* 1993; **39** (3): 400-404
17. Wang L, Saito M, Tatsumi E and Li L. Antioxidative and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of sufu (fermented tofu) extracts. *Japan Agricultural Research Quarterly* 2003; **37** (2): 129-132.
18. Jackson K. The Role of Zinc in Men's Health. http://www.uspharmacist.com/index.asp?show=article&page=8_1546.htm. Consultado el 25 Noviembre de 2007
19. Reeves P and Rossow KI. Zinc deficiency affects the activity and protein concentration of angiotensin-converting enzyme in rat testes *Experimental Biology and Medicine* 1993; **203**: 336-342.
20. Raasch W, Bartels T, Gieselberg A, Dendorfer A and Dominiak P. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition Increases Cardiac Catecholamine Content and Reduces Monoamine Oxidase Activity via an Angiotensin Type 1 Receptor-Mediated Mechanism. *Journal of Pharmacology*. 2002; **300** (2): 428-434.
21. Vago T, Bevilacqua F, Baldi G, Ongini E, Chebat E, Monopoli A, and Norbiato G. Angiotensin converting enzyme binding sites in human heart and lung: comparison with rat tissues. *British Journal of Pharmacology* 1992; **107**(3): 821-825