

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES DE PARAGUAY SOBRE ALDOZA REDUCTASA DE CRISTALINO DE RATA

[Inhibitory activity of extracts from medicinal plant of Paraguay on rat lens
aldose reductase]

ESTEBAN ANTONIO FERRO BERTOLOTO¹ & ROSA DEGEN DE
ARRÚA²

Departamentos de Fitoquímica¹ y de Botánica². Dirección de Investigaciones. Facultad de
Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus de la UNA, San Lorenzo.

Paraguay

eaferropy@yahoo.com

RESUMEN: La acumulación de polioles en el cristalino debido a la actividad aldosa reductasa (AR) y la alta disponibilidad de glucosa en la diabetes mellitas, se reconoce como uno de los procesos involucrados en la formación de cataratas y de otras lesiones orgánicas asociadas a la hiperglicemia, y la búsqueda de inhibidores sintéticos y naturales motivó mucha investigación. Los procedimientos de aislamiento bio-guiado demostraron ser eficaces para reconocer moléculas de fuentes naturales con capacidad para inhibir AR. En el presente trabajo se informa de los resultados obtenidos con 22 extractos de especies consideradas medicinales en cuanto a su capacidad de inhibir *in vitro* la actividad AR de cristalinos de rata observándose inhibición interesante como para continuar su estudio en *Gochnatia polymorpha*, cambará (85,4%), *Caesalpinia paraguariensis*, guayacán (79,9%), *Schinus terebinthifolius*, molle-í (55,1%), *Psidium guajava*, guayaba (54,4%), *Lippia alba*, salvia (50,4%) y *Protium heptaphyllum*, ysy (48,6%). Los valores de concentración inhibitoria media para los extractos referidos se encuentran entre 2,5 y 7,8 µg/mL, para *Protium heptaphyllum* y *Psidium guajava*, respectivamente, aunque ninguna de estas especies se menciona popularmente para el tratamiento de la diabetes.

Palabras clave: aldosa reductasa, plantas medicinales, Paraguay, inhibición

SUMMARY: Polyols accumulation in lenses due to the aldose reductase activity and the increased glucose availability in diabetes mellitus is recognized as one of the mechanisms involved in the support to the search of both synthetic and natural AR inhibitors. Bioguided isolation process had demonstrated to be good procedures to accomplish such search. In the present paper is presented the inhibitory activity on rat lens AR of 22 extracts prepared from Paraguayan medicinal plants. Those that exhibited promisory inhibition, in order to continue their study were *Gochnatia polymorpha*, cambará (85,4%), *Caesalpinia paraguariensis*, guayacán (79,9%), *Schinus terebinthifolius*, molle-í (55,1%), *Psidium guajava*, guayaba (54,4%), *Lippia alba*, salvia (50,4%) and *Protium heptaphyllum*, ysy (48,6%). Mean inhibitory values for these extracts lay between 2,5 and 7,8 µg/mL, for *Protium heptaphyllum* and *Psidium guajava*, respectively. None of the active extract is associated to species popularly employed in Paraguay for the treatment of diabetes.

Key words: aldose reductase, medicinal plants, Paraguay, inhibition

Manuscrito recibido: 28 de diciembre 2011.

Manuscrito aceptado: 2 de abril de 2012.

INTRODUCCION

La actividad aldosa reductasa (EC 1.1.1.21) está relacionada con un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas, las aldo-ceto reductasas (AKR.), que están presentes en todos los organismos desde las levaduras hasta el hombre, y en los humanos la mayor actividad aldehído reductasa se encuentra en riñón e hígado y cataliza una variedad de reacciones de oxidación – reducción, de metabolitos endógenos y xenobióticos, abarcando una gran variedad de grupos carbonilo como los de glucosa, varios esteroides, productos finales de glicosilación, productos de la peroxidación de lípidos, drogas y contaminantes ambientales, prefiriendo NADPH sobre NADH como cofactor (Barski *et al.*, 2008). La enzima aldosa reductasa (AR) o AKR1B1 es una de las más estudiadas de esta familia. La misma fue reconocida por Hers en 1956 (Hers, 1956) y poco después ya se la relacionó con algunas complicaciones asociadas a la diabetes (van Heyningen, 1959; Gabbay *et al.*, 1966) y si bien no puede explicar todos los desenlaces, se asume que la formación de polioles asociada a la hiperglicemia resulta en hiperosmolaridad que daña las fibras de los cristalinos conduciendo a la acumulación de líquido y su posterior ruptura (Gabbay *et al.*, 1966; Pollreisz & Schmidt-Erfurth, 2010). También desde hace tiempo se preconiza que la inhibición de AR proporciona un recurso valioso para evitar la propagación del daño asociado a la acumulación de polioles en varios tejidos, con especial atención en el cristalino ocular y el subsecuente desarrollo de cataratas (Dvornik *et al.*, 1973; Kinoshita, 1990).

Con un número importante de personas afectadas por la diabetes, que alcanzaría los 439 millones para el año 2030, de acuerdo con las estimaciones de la Federación Internacional de Diabetes (Pollreisz & Schmidt-Erfurth, 2010), es importante plantear la búsqueda de moléculas que sean capaces de prevenir o por lo menos disminuir la progresión de daños a diferentes tejidos.

Además de la búsqueda de inhibidores sintéticos, los vegetales se manifestaron como fuentes interesantes, y los flavonoides quercetina, quercitrina y miricitrina fueron reconocidos como potentes inhibidores (Varma *et al.*, 1975), así como C-glucósidos de flavonas presentes *Cannabis sativa* (Segelman *et al.*, 1977). Se dispone de numerosas referencias en las que se informa de la actividad de extractos y compuestos aislados de los mismos en cuanto a su capacidad de inhibir AR, y las características estructurales requeridas para lograr ese efecto, destacando que los compuestos con estructuras relacionadas con flavonoides son los más frecuentes (Chaudhry *et al.*, 1983; Kawanishi *et al.*, 2003).

Los procedimientos de aislamiento bio-guiado demostraron ser eficaces para reconocer moléculas de fuentes naturales con capacidad para inhibir AR, y los primeros trabajos referidos a la actividad inhibitoria de plantas medicinales de Paraguay sobre esta enzima fueron realizados en el marco de un proyecto de cooperación entre la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, Paraguay y la Universidad Médica y Farmacéutica de Toyama, Japón. En el primero de ellos se caracterizó como el componente activo de *Acanthospermum australe*, tapecué, a 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona, demostrando inhibición no competitiva similar a la

observada con quercitrina, pero 18 veces más potente que ésta (Shimizu *et al.*, 1987). En la segunda publicación se informa de la inhibición *in vitro* de AR por parte del extracto hidroalcohólico de *Phyllanthus niruri*, para-paraí mí, del que se aisló como el compuesto más activo al ácido ellágico (Shimizu *et al.*, 1989). En el marco del citado proyecto se colectaron especies reconocidas popularmente como medicinales en Paraguay y se prepararon extractos para someterlos a tamizado de actividad biológica frente a diversos sistemas *in vitro* e *in vivo*.

En el presente trabajo se informa de los resultados obtenidos con 22 extractos de especies consideradas medicinales en cuanto a su capacidad de inhibir *in vitro* la actividad AR de cristalinos de rata.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Las muestras de plantas fueron colectadas e identificadas en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, y los respectivos ejemplares se encuentran depositados en el Herbario FCQ de dicha institución. Para la nomenclatura botánica se empleó la base de datos TROPICOS (2012). Las determinaciones taxonómicas, el material examinado y las partes empleadas en la preparación de los extractos se detallan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Especies empleadas en la evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* de aldosa reductasa de cristalino de rata.

Nombre común	Nombre científico	Familia	Parte empleada	Material examinado
Aguapé puru á	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	<i>Pontederiaceae</i>	Planta entera	I. Basualdo & M. Ortiz, 6741 (FCQ)
Altamisa	<i>Ambrosia elatior</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Parte aérea	N. Soria, 1089 (FCQ)
Araticu í	<i>Rollinia emarginata</i> Schltdl.	<i>Annonaceae</i>	Parte aérea	I. Basualdo 1538 (FCQ)
Ca'a ré	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	<i>Chenopodiaceae</i>	Parte aérea y sumidad florida	N. Soria 1287 (FCQ)
Ca'a tai	<i>Polygonum punctatum</i> Elliott	<i>Polygonaceae</i>	Planta entera	F. Mereles, 642 (FCQ)
Cabello de ángel	<i>Cuscuta. xanthochortos</i> Mart.ex Engl.	<i>Convolvulaceae</i>	Planta entera	N. Soria, 736 (FCQ)

Calaguala	<i>Campyloneurum phyllitidis</i> (L.) C. Presl	<i>Polypodiaceae</i>	Planta entera	I. Basualdo & M. Ortiz, 6745 (FCQ)
Cambará	<i>Gochnatia polymorpha</i> (Less.) Cabrera	<i>Asteraceae</i>	Hojas	R. Degen, 7 (FCQ)
Caraguatá	<i>Bromelia balansae</i> Mez	<i>Bromeliaceae</i>	Frutos	N. Soria, 1896 (FCQ)
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	<i>Myrtaceae</i>	Hojas	I. Basualdo, 766 (FCQ)
Guayacán	<i>Caesalpinia paraguariensis</i> (D. Parodi) Burkart	<i>Fabaceae</i>	Corteza	I. Basualdo, 1589 (FCQ)
Malva blanca	<i>Sida cordifolia</i> L.	<i>Malvaceae</i>	Sumidad florida	I. Basualdo, 1062 (FCQ)
Molle í	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi var. <i>pohlianus</i> Engl.	<i>Anacardiaceae</i>	Parte aérea	N. Soria, 1116 (FCQ)
Paratodo	<i>Tabebuia aurea</i> (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore	<i>Bignoniaceae</i>	Corteza	I. Basualdo, 2420 (FCQ)
Penicilina	<i>Alternanthera brasiliana</i> . (L.) Kuntze	<i>Amaranthaceae</i>	Parte aérea	R. Degen, 8 (FCQ)
Pindó	<i>Arecastrum romanzoffianum</i> (Cham.) Becc.	<i>Palmaceae</i>	Raíz	I. Basualdo, 364 (FCQ)
Salvia	<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson	<i>Verbenaceae</i>	Parte aérea	M. Ortiz, 537 (FCQ)
Sará morotí	<i>Citharexylum myrianthum</i> Cham	<i>Verbenaceae</i>	Corteza	I. Basualdo, 1215 (FCQ)
Sauco	<i>Sambucus australis</i> Cham. & Schlttdl.	<i>Caprifoliaceae</i>	Parte aérea	I. Basualdo, 775 (FCQ)
Taperyva hu	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	<i>Fabaceae</i>	Hojas	N. Soria, 1068 (FCQ)
Ybopé	<i>Gleditsia amorphoides</i> (Griseb.) Taub.	<i>Fabaceae</i>	Hojas	I. Basualdo, 1508 (FCQ)
Ysy	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	<i>Burseraceae</i>	Hojas	N. Soria, 2212 (FCQ)

Preparación de extractos vegetales. Cada material, debidamente etiquetado, fue secado a temperatura ambiente, a la sombra y reducido a polvo por medio de un molino de cuchillas inmediatamente antes de su extracción. Cantidades de 100 a 300 g de material vegetal seco fueron extraídas con una mezcla etanol – agua 7:3 por tres veces, a ebullición durante una hora cada vez. Se empleó etanol de 95° previamente destilado y agua desionizada y destilada para la preparación de la mezcla extractiva. Los extractos fueron filtrados en caliente y reunidos, para eliminar posteriormente el alcohol por des-

tilación a presión reducida a 40° C en un evaporador rotatorio (Yamato, Japón). Los extractos evaporados se congelaron a -20° C y se liofilizaron a 20° C y 100 mTorr (Nihon Freezer, Japón) hasta la eliminación del agua residual. Los extractos secos se pesaron y conservaron en desecador hasta el momento de su uso.

Extracción de la enzima. La enzima aldosa reductasa (EC 1.1.1.21) fue extraída de cristalininos de rata siguiendo el procedimiento de Hayman y Kinoshita (1966), con modificaciones y se empleó una preparación cruda de enzima. Se emplearon ratas Wistar machos, de 200 a 300 g obtenidas del Bioterio de la Universidad Médica y Farmacéutica de Toyama, Toyama, Japón. Las ratas se anestesiaron con éter etílico y se sacrificaron por dislocación cervical, los cristalininos se extrajeron con la ayuda de tijeras y se sumergieron en una disolución amortiguadora de fosfatos 0,1 M de pH 6,8 conteniendo 1mM de 2-mercaptoetanol y 1 mM de NADPNa, a razón de 0,1 mL por cada cristalino. Los cristalininos se conservaron a -25° C hasta el momento de extraer la enzima, para lo cual se descongelaron entre 8 y 10 cristalininos en baño de agua a 4° C y se transfirieron a un homogenizador manual de tejidos en el que se procesaron hasta obtener una emulsión lechosa, que fue transferida a tubos previamente refrigerados (4° C) para su centrifugación a 10.000 /g durante 15 minutos. El líquido sobrenadante conteniendo la enzima cruda se recuperó por medio de una pipeta Pasteur y se transfirió a viales mantenidos en baño de hielo. En todo el proceso de extracción y ensayo de la actividad enzimática se emplearon productos químicos de calidad analítica (Wako Chemicals, Japón).

Actividad enzimática. La actividad AR de la enzima cruda se ensayó utilizando el decaimiento de la absorbancia a 340 nm de una disolución de NADPH 0,104 mM en amortiguador de fosfatos 0,1 M a pH 6,2, en presencia y ausencia de \pm - gliceraldehído como sustrato. La enzima se diluyó con disolución amortiguadora de fosfatos 0,1 M a pH 6,8 hasta la actividad que mostraba en 200 segundos una reducción del 70% de la absorbancia inicial a 340 nm y 25° C, empleando un espectrofotómetro Hitachi 220 UV (Hitachi, Japón) y cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. De esta forma se estableció una actividad de 72,50 U/mL, considerando una unidad de enzima la que se asocia a la oxidación 1 nmol de NADPH por minuto. La concentración de proteínas de la preparación se determinó por el método de Bradford con un reactivo comercial (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratorios, Richmond, EUA) con albúmina sérica bovina como referencia, resultando una concentración de 3,95 mg/mL. La enzima cruda con actividad específica de 18,35 U/mg de proteína se conservó a alícuotas congeladas a -78° C hasta el momento de realizar los ensayos.

Preparación de muestras para ensayo. Se pesaron alícuotas de los extractos vegetales liofilizados y se disolvieron con dimetilsulfóxido (Wako Chemicals, Japón) hasta obtener disoluciones de concentración 10 μ g/mL. Como control positivo se empleó una disolución de quercitrina (Sigma, EUA) de 1 μ g/mL en dimetilsulfóxido.

Ensayo de inhibición de AR *in vitro*. Para evaluar el efecto de los extractos sobre la actividad de la enzima se prepararon disoluciones en amortiguador de fosfatos 0,1 M de pH 6,2 conteniendo NADPH.Na a concentración 0,104 mM, con y sin \pm - gliceraldehído 10 mM como sustrato. La disolución sin sustrato fue empleada como blanco de lectura. Las disoluciones se conservaron a 25° C durante todo el ensayo, con agitación cada 5 minutos. Adicionalmente se prepararon blancos de muestras, tal como se muestra en la **Tabla 2**. En todos los casos se adicionó 0,020 mL de disolución de la enzima a 25° C a cada cubeta, 40 segundos antes de iniciar el registro de la absorbancia. Los contenidos de las cubetas se agitaron manualmente mediante varillas de vidrio. La reacción enzimática se monitorizó en un espectrofotómetro visible ultravioleta Hitachi 220 UV a 340 nm, en modo barrido y la respuesta se imprimió en papel a 60 mm/min, en una escala de absorbancia de 0,00 a 0,05 DO, durante 200 segundos. En cada lote de ensayos se corrieron blancos sin muestras hasta obtener condiciones estables, 40 – 70 minutos después de agregar el cofactor y cada 4 muestras. Se consideraron ensayos válidos aquellos que presentaban decaimiento lineal de la absorbancia a 340 nm, lo que ocurrió entre 230 y 260 minutos después de la disolución de NADPH.Na. Las muestras se procesaron por duplicado, y cuando presentaban valores discordantes se repitió el ensayo. El detalle de los componentes del ensayo enzimático con sus volúmenes respectivos se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Distribución de los componentes del ensayo de inhibición de AR de cristalino de rata.

Disoluciones	Control	Blanco 1	Muestra	Blanco 2
\pm gliceraldehído 10 mM en amortiguador fosfato 0,1 M pH 6,2 (mL)	0,97	-	0,97	-
Amortiguador fosfato 0,1 M pH 6,2 (mL)	-	0,97	-	0,97
Agua o dimetilsulfóxido (mL)	0,01	0,01	-	-
Muestra (mL)	-	-	0,01	0,01
Enzima AR (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02

Cálculo de la actividad inhibitoria. Se estimó el porcentaje de inhibición de la enzima en las condiciones de ensayo mediante la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{Abs. Control} - \text{Abs. Blanco 1}) - (\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco 2})}{(\text{Abs. Control} - \text{Abs. Blanco 1})} \times 100$$

Para las muestras que mostraron inhibición de hasta 50% en las condiciones de ensayo se evaluó la capacidad inhibitoria a diferentes concentraciones a fin de determinar gráficamente la concentración inhibitoria media (CI50) a partir de la representación del porcentaje de inhibición frente al logaritmo de la concentración de las muestras.

RESULTADOS

De los extractos analizados en cuanto a su capacidad de inhibir *in vitro* la enzima aldosa reductasa de cristalino de rata, se observaron valores que resultan interesantes como para continuar su estudio en *Gochnatia polymorpha*, “cambará” (85,4%), *Caesalpinia paraguariensis*, “guayacán” (79,9%), *Schinus terebinthifolius* var. *pohlianus*, “molle-í” (55,1%), *Psidium guajava*, “guayaba” (54,4%), *Lippia alba*, “salvia” (50,4%) y *Protium heptaphyllum*, “ysy” (48,6%). Los valores de concentración inhibitoria media para los extractos referidos se encuentran entre 2,5 y 7,8 µg/mL, para *Protium heptaphyllum* y *Psidium guajava*, respectivamente.

El detalle de los resultados de los ensayos de inhibición se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Actividad inhibitoria sobre aldosa reductasa de cristalino de rata de extractos hidroalcohólicos de plantas medicinales de Paraguay.

Nombre común	Nombre científico	Inhibición (%)	Concentración inhibitoria media (µg/mL)
Aguapé puru á	<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	21,1	-
Altamisa	<i>Ambrosia elatior</i> L.	36,3	-
Araticu í	<i>Rollinia emarginata</i> Schtdl.	31,0	-
Ca'a ré	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	9,2	-
Ca'a tái	<i>Polygonum punctatum</i> Elliot	20,1	-
Cabello de ángel	<i>Cuscuta xanthoschortos</i> Mart. ex Engl.	35,0	-
Calaguala	<i>Campyloneurum phyllitidis</i> (L.) C. Presl	29,9	-
Cambará	<i>Gochnatia polymorpha</i> (Less.) Cabrera	85,4	3,0
Caraguatá	<i>Bromelia balansae</i> Mez	23,8	-
Guayaba	<i>Psidium guajava</i> L.	54,4	7,8
Guayacán	<i>Caesalpinia paraguariensis</i> (D. Parodi) Burkart	79,9	4,3
Malva blanca	<i>Sida cordifolia</i> L.	30,6	-
Molle í	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi. var <i>pohlianus</i> Engl.	55,1	2,8
Paratodo	<i>Tabebuia aurea</i> (Solva Manso) Benth & Hook. f. ex S. Moore	44,7	-
Penicilina	<i>Alternanthera brasiliana</i> (L.) Kuntze.	26,6	-
Pindó	<i>Arecastrum romanzoffianum</i> (Cham.) Becc.	16,4	-
Salvia	<i>Lippia alba</i> (Miller) N. E. Br. ex Britton & P. Wilson	50,4	5,0
Sará morotí	<i>Citharexylum myrianthum</i> Cham	51,3	-
Sauco	<i>Sambucus australis</i> Cham. & Schtdl.l.	28,2	-

Taperyva hu	<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link.	28,2	-
Ybopé	<i>Gleditsia amorphoides</i> (Griseb.) Taub.	34,4	-
Ysy	<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	48,6	2,5
Inhibidor de referencia: quercitrina		-	1,0 (2,45 μ M)

DISCUSION

La acumulación de polioles en el cristalino debido a la actividad aldosa reductasa y la alta disponibilidad de glucosa en la diabetes mellitus se reconoce como uno de los procesos involucrados en la formación de cataratas y de otras lesiones orgánicas asociadas a la hiperglicemia (Barski *et al.*, 2008; Pollreisz & Schmidt-Erfurth, 2010; Kinoshita, 1990).

La búsqueda de inhibidores eficaces que impidan o retrasen la aparición de estas lesiones condujo a la identificación de diversas moléculas sintéticas, entre las que se cuentan como las más efectivas aquellas que poseen funciones de ácido carboxílico, como tolrestat, o espirohidantoinas, como sorbinil (Barski *et al.*, 2008), incluso ácido dicarboxílicos como el tetrametilén glutárico, que fue uno de los primeros inhibidores ensayados (Branlant, 1982), y a la fecha incluso se identificaron fracciones lipofílicas de riñón humano y cristalino bovino que actúan como inhibidores endógenos de AR (Kador *et al.*, 2001). Compuestos de origen vegetal de amplia distribución, como los flavonoides quercetina y rutina se ensayaron como inhibidores de AR, y si bien resultaron activos, se consideró su acción como inespecífica (Varma *et al.*, 1975; Wermuth, 1985). Con la intención de comparar las distintas enzimas con la actividad reductasa y apuntando a reconocer moléculas con capacidad inhibitoria ya se caracterizaron los residuos de aminoácidos comprometidos en la catálisis (Carper *et al.*, 1995).

La revisión publicada por Kawanishi *et al.* (2003) resalta el carácter poco satisfactorio de los inhibidores sintéticos de AR, que en general no superaron los ensayos clínicos a gran escala (Barski *et al.*, 2008), y anima a la búsqueda de moléculas naturales para las que se proponen relaciones estructura – actividad, como una estructura dominante polar y un anillo hidrofóbico.

Los compuestos naturales que más frecuentemente se citan como activos en la literatura frente a AR contienen grupos fenólicos, incluyendo algunos extraídos de organismos marinos como tunicados que manifiestan ser más activos que sorbinil y carecen de las características estructurales típicas de los inhibidores sintéticos (Manzanaro *et al.*, 2006). Compuestos entre los que se cuentan un derivado del ácido quínico y una dihidrochalcona están presentes en *Artemisia dracunculus* y presentan interesante actividad inhibitoria de AR (Logendra *et al.*, 2006), y otros con estructura de naturaleza terpénica, como la isoliquiritigenina aislada de regaliz que además muestra actividad antiagregante plaquetaria (Tawata *et al.*, 1992), y sesquiterpenos con esqueleto de tipo eudesmano, de las flores de *Chrysanthemum indicum* (Yoshikawa *et*

al., 1999) o las partes aéreas de *Salacia chinensis* (Morikawa *et al.*, 2003). También se reconoció la actividad inhibitoria sobre esta enzima por parte sales de los alcaloides isoquinolínicos berberina y palmartina aislados de las raíces de *Coptis japonica*, y si bien muestran menor actividad que quercitrina, abren una nueva pista al desarrollo de moléculas con actividad inhibitoria (Lee, 2002).

En lo que respecta a las especies incluidas en el presente trabajo, no se encontraron referencias de estudios anteriores sobre la actividad informada, sin embargo, en coincidencia con la actividad observada para el extracto de *Caesalpinia paraguariensis*, guayacán, se informa la actividad inhibitoria de AR del ácido ellágico y derivados reconocidos en los frutos de *Caesalpinia ferrea*, empleados tradicionalmente en el Brasil para el tratamiento de la diabetes (Ueda *et al.*, 2001; 2004), y para *Syagrus romanzoffianum*, pindó (*Arecastrum romanzoffianum*) se informa de su uso popular para tratar la diabetes (Pin *et al.*, 2009), que podría validarse a partir del aislamiento a partir de sus semillas de estilbenos y estilbenolignanos con actividad inhibitoria de α -glucosidasa y capacidad para reducir la glicemia postprandial en ratas (Lam *et al.*, 2008; Lam & Lee, 2010). Las especies cuyos extractos demostraron mayor actividad en el presente estudio no tienen indicación en la medicina popular del Paraguay para el tratamiento de la diabetes, pero las hojas de *Psidium guajava*, se emplean en África para ese propósito, y en la literatura se informa su actividad hipoglicemiante (Ojewole, 2005), lo que refuerza el interés de seguir investigando esta especie.

Si bien los resultados de este trabajo estimulan a la identificación de las moléculas activas mediante procedimientos de aislamiento bio – guiado, la inhibición de AR no puede ser considerada únicamente como un blanco terapéutico para las complicaciones de la diabetes mellitus dado el amplio espectro de efectos biológicos asociado a las proteínas AKR y a la baja especificidad de algunas isoformas, con capacidad para inhibir a una gran variedad de aldehídos endógenos y exógenos (Barski *et al.*, 2008). A la actividad AR se asocian además, roles antioxidantes, preventivos de daños al sistema cardiovascular y como componente crítico de la señalización intracelular, lo que nos obliga a evaluar cuidadosamente la utilidad de su inhibición para prevenir los trastornos asociados a la diabetes, sin perturbar la capacidad detoxificante sobre aldehídos que pueden vincularse con las complicaciones con base micro y macrovascular, y a obtener moléculas con actividad inhibitoria más específica (Ojewole, 2005). La evaluación de moléculas inhibitorias de la actividad AR requiere de la realización de ensayos clínicos con puntos finales clínicos bien definidos y mayor potencia estadística que los estudios disponibles para proporcionar evidencia aceptable de la eficacia de tales agentes (Srivastava *et al.*, 2005), sin embargo, los seres humanos no son los únicos destinatarios de estos inhibidores y se evaluó el retraso de la progresión de cataratas en perros con diabetes mellitus espontánea mediante la aplicación tópica de una formulación comercial (Kador *et al.*, 2010).

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento a la Facultad de Ciencias Químicas de la UNA en la persona del Prof. Dr. Luis H. Berganza por su apoyo a mi formación científica y al desarrollo de la Química de Productos Naturales en el Paraguay, a la Agencia de Cooperación Internacional del Japón, JICA por dar soporte al proyecto “Chemical and Pharmaceutical Study on Herbs with Paraguay”; a los colegas de la Universidad Médica y Farmacéutica de Toyama, Japón, especialmente a M. Shimizu y S. Horie por el entrenamiento en la realización de los bioensayos y a los investigadores de la Facultad de Ciencias Químicas al momento de desarrollarse el mencionado proyecto realizado en los años 1985-1988, del Departamento de Botánica por la colecta e identificación del material vegetal, y a L. Franco, C. Theoduloz y G. Schmeda del Departamento de Fitoquímica por su apoyo en el laboratorio en la obtención de los extractos.

BIBLIOGRAFÍA

- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A. 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev.* 40: 553-624.
- Branlant, G. 1982. Properties of an aldose reductase from pig lens: comparative studies of an aldehyde reductase from pig lens. *Eur. J. Biochem.* 129: 99 – 104.
- Carper, D.A., Hohman, T.C., Old, S.E. 1995. Residues affecting the catalysis and inhibition of rat lens aldose reductase. *Biochim Biophys Acta.* 1246: 67-73.
- Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D. 1983. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* 32:1995-1998.
- Dvornik, E., Simard-Duquesne, N., Krami, M., Sestanjan, K., Gabbay, K.H., Kinoshita, J.H., Varma, S.D., Merola, L.O. 1973. Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats: control by an aldose reductase inhibitor. *Science* 182:1146-8.
- Gabbay, K.H., Merola, L.O., Field, R.A. 1966. Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 151:209-210.
- Hayman, S., Kinoshita, J. H. 1966. Isolation and properties of lens aldose reductase. *J Biol Chem.* 240: 877-882.
- Hers, H.G. 1956. The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta* 22: 202–203.
- Kador, P.F., Sun, G., Rait, V.K., Rodriguez, L., Ma, Y., Sugiyama, K. 2001. Intrinsic inhibition of aldose reductase. *J Ocul Pharmacol Ther.* 17: 373-381.
- Kador, P.F., Webb, T.R., Bras, D., Ketrings, K., Wyman, M. 2010. Topical KINOSTAT™ ameliorates the clinical development and progression of cataracts in dogs with diabetes mellitus. *Vet Ophthalmol.* 13: 363-368.
- Kawanishi, K., Ueda, H., Moriyasu, M. 2003. Aldose reductase inhibitors from the nature. *Curr Med Chem.* 10: 1353-1374.

- Kinoshita, J.H. 1990. A thirty year journey in the polyol pathway. *Exp Eye Res.* 50: 567-73.
- Lam, S.-H., Chen, J.-M., Kang, C.-J., Chen, C.-H., Lee, S.-S. 2008. α -Glucosidase inhibitors from the seeds of *Syagrus romanzoffiana*. *Phytochem.* 69: 1173-1178.
- Lam, S.H., Lee, S.S. 2010. Unusual stilbenoids and a stilbenolignan from seeds of *Syagrus romanzoffiana*. *Phytochem.* 71: 792-797.
- Lee, H.-S. 2002. Rat lens aldose reductase inhibitory activities of *Coptis japonica* root-derived isoquinoline alkaloids. *J Agric Food Chem.* 50: 7013–7016.
- Logendra, S., Ribnicky, D.M., Yang, H., Poulev, A., Ma, J., Kennelly, E.J., Raskin, I. 2006. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus*. *Phytochem.* 67: 1539-1546.
- Manzanaro, S., Salva, J., de la Fuente, J.A. 2006. Phenolic marine natural products as aldose reductase inhibitors. *J Nat Prod.* 69: 1485-1487.
- Morikawa, T., Kishi, A., Pongpiriyadacha, Y., Matsuda, H., Yoshikawa, M. 2003. Structures of new friedelane-type triterpenes and eudesmane-type sesquiterpene and aldose reductase inhibitors from *Salacia chinensis*. *J Nat Prod.* 66: 1191-1196.
- Ojewole, J.A.O. 2005. Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. *Methods Find Experim Clin Pharmacol.* 27: 689-695.
- Pin, A., González, G., Marín, G., Cretton, S., Christen, P., Rouget, D. 2009. *Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción*. Asunción. Proyecto Etnobotánica Paraguay – Université de Genève.
- Pollreisz, A., Schmidt-Erfurth, U. 2010. Diabetic cataract— Pathogenesis, epidemiology and treatment. *J Ophthalmol.* 608751, 2-8.
- Segelman, A.B., Segelman, F.P., Varma, S.D., Wagner, H., Seligmann, O. 1977. *Cannabis sativa* L. (marijuana) IX: Lens aldose reductase inhibitory activity of marijuana flavone C-glycosides. *J Pharm Sci.* 66: 1358-1359.
- Shimizu, M., Horie, S., Arisawa, M., Hayashi, T., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Kawasaki, M., Terashima, S., Tsuji, H., Wada, S., et al. 1987. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. I. Isolation and identification of lens aldose reductase inhibitor from "tapecué," *Acanthospermum australe* O.K. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 35(3): 1234-1237.
- Shimizu, M., Horie, S., Terashima, S., Ueno, H., Hayashi, T., Arisawa, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N. 1989. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan crude drug "Para-parai mí," *Phyllanthus niruri*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 37: 2531-2532.
- Srivastava, S.K., Ramana, K.V., Bhatnagar, A. 2005. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Rev.* 26: 380–392.
- Tawata, M., Aida, K., Noguchi, T., Ozaki, Y., Kume, S., Sasaki, H., Chin, M., Onaya, T. 1992. Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice. *Eur J Pharmacol.* 212: 87-92.

- TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. 2012. <<http://www.tropicos.org>>.
- Ueda, H., Tachibana, Y., Moriyasu, M., Kawanishi, K., Alves, S.M. 2001. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomedicine* 8: 377-381.
- Ueda, H., Kawanishi, K., Moriyasu, M. 2004. Effects of ellagic acid and 2-(2,3,6-trihydroxy-4-carboxyphenyl)ellagic acid on sorbitol accumulation *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull.* 27: 1584-1587.
- van Heyningen, R. 1959. Formation of polyols by the lens of the rat with 'sugar' cataract. *Nature* 1959; 468:194-195.
- Varma, S.D., Mikuni, I., Kinoshita, J.H. 1975. Flavonoids as inhibitors of lens aldose reductase. *Science* 188:1215-1216.
- Wermuth, B. 1985. Aldo-keto reductases. *Prog Clin Biol Res.* 174: 209-230.
- Yoshikawa, M., Morikawa, T., Murakami, T., Toguchida, I., Harima, S., Matsuda, H. 1999. Medicinal flowers. I. Aldose reductase inhibitors and three new eudesmane-type sesquiterpenes, kikkanols A, B, and C, from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 47: 340-345.