

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ÁCIDO CAFEICO COMO AGENTE REDUCTOR DEL RIESGO DE ATEROESCLEROSIS A PARTIR DE LA β -OXIDACIÓN DE LAS LDL_C.

Valeria Sánchez Luna¹, Valeria Villalobos Porras², Eduardo Arguedas Chaverri³ y Alfredo Monge Fallas⁴.

1,2. Licenciadas en Farmacia. Universidad de Iberoamérica (UNIBE), Facultad de Farmacia.

3. Ph.D en Química. Director de tesis.

4. Doctor y tutor de tesis. Facultad Farmacia (UNIBE)

Resumen

El riesgo cardiovascular se produce porque el colesterol que está en exceso en la sangre puede almacenarse dentro de las arterias que transportan la sangre desde el corazón hasta el resto del cuerpo. La acumulación de colesterol dentro de estos vasos sanguíneos hará que éstos se angosten, esto se llama aterosclerosis. Depósitos grandes de colesterol pueden bloquear completamente la arteria, de modo tal que la sangre no puede fluir a través de ella. Si la arteria coronaria, que es el vaso que suministra sangre a los músculos dentro del corazón, se bloquea puede ocurrir un infarto agudo al miocardio. Por lo anterior, la presente investigación tiene como propósito vincular la aterosclerosis y la dislipidemias con el ácido cafeico, ya que se ha encontrado a través de lectura e información científica que este es un ácido hidroxinámico vinculado a poseer propiedades antioxidantes, por lo tanto ayuda a mejorar el funcionamiento celular, aumentando la combustión de grasas y evitando la acción de radicales libres, que pueda potenciar la formación de las placas de ateroma en las arterias.

Palabras clave: Colesterol, aterosclerosis, dislipidemia, ácido cafeico, antioxidante.

Abstract

The cardiovascular risk takes place because the cholesterol that is in excess in the blood can be stored inside the arteries that transport the blood from the heart up to the rest of the body. The accumulation of cholesterol inside these blood glasses will do that these get narrow, this calls atherosclerosis. Big warehouses of cholesterol can block completely the artery, in a such way that the blood cannot flow across her. If the coronary artery which is the glass that supplies blood to the muscles inside the heart, is blocked a sharp heart attack can happen to the myocardium. For the previous thing, the present investigation has as intention link the atherosclerosis and the dislipidemias with the acid cafeico, since he has been across reading and scientific information that this one is an acid hidroxinámico linked to possessing antioxidant properties therefore it helps to improve the cellular functioning, increasing the combustion of fats and avoiding the action of radical free that could promote the formation of the plates of ateroma in the arteries.

Key words: Cholesterol, atherosclerosis, dislipidemia, acid cafeico, antioxidant.

Introducción

Las lipoproteínas plasmáticas transportan de un órganos a otro las moléculas lipídicas (triacilglicerol, fosfolípidos y colesterol) a través del torrente sanguíneo la lipoproteínas se clasifican según su densidad, los quilomicrones que son lipoproteínas grandes de densidades extremadamente bajas transportan los triacilgliceroles y esterios de colesterol de alimentos desde el intestino hasta el tejidos muscular y adiposo.

Las lipoproteínas de muy bajas densidad (VLDL) que se sintetizan en el hígado

transportan los lípidos a los tejidos. Al perder los triacilgliceroles y algunos fosfolípidos las VLDL se reducen de tamaño, se hacen más densa y reciben el nombre, lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Las IDL siguen perdiendo triacilglicerol para formar una lipoproteína de mayor densidad, llamada proteína de baja densidad o bien son retiradas del torrente sanguíneo por el hígado. Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son los principales trasportadores de colesterol y esterios de colesterol a los tejidos, en un proceso complejo en donde las partículas de LDL son endocitadas por las células tras

unirse a los receptores de LDL. El objetivo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), partículas ricas en proteínas producidas en el hígado y en el intestino, parecen mediar la eliminación del colesterol excesivo de las membranas celulares y de los esteres de colesterol de las VLDL y de las LDL.¹

El colesterol es un lípido con una estructura bastante diferente de la de los fosfolípidos. Es un esteroide formado por la unión de cuatro anillos hidrocarbonados. A un extremo del esteroide se le une una cola hidrocarbonada y al otro un grupo hidroxilo. En las membranas la molécula se orienta paralela a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos y el grupo hidroxilo interacciona con la cabeza polar de los fosfolípidos vecinos.

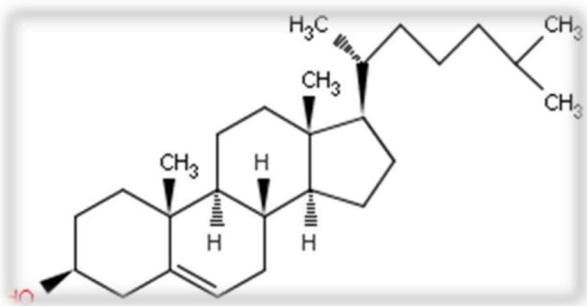


Figura 1. Molécula de Colesterol

Poco más de la mitad del colesterol del cuerpo surge por síntesis (alrededor de 700 mg/día) y el resto proviene de la dieta promedio. En los seres humanos, el colesterol se sintetiza prácticamente en todos los tejidos, aunque el hígado, el intestino, la corteza suprarrenal y los tejidos reproductores, incluidos los ovarios, los

testículos y la placenta, son los que más contribuyen a la reserva del colesterol del organismo. Como ocurre con los ácidos grasos, todos los átomos de carbono provienen de acetil-coenzima A (acetil CoA).²

La aterosclerosis es un tipo de endurecimiento de las arterias. El termino aterosclerosis, que deriva del griego atheros (pasta) y sclerosis (dureza), denota la formación de lesiones fibroadiposas en la íntima de las arterias grandes y medianas, como la aorta y sus ramas, las arterias coronarias y las arterias grandes que irrigan el cerebro.³

Otro modelo contempla la aterosclerosis como una respuesta inflamatoria y de cicatrización crónica de la pared arterial tras una lesión endotelial. La progresión de la lesión ocurre por interacción de las lipoproteínas modificadas, los macrófagos derivados de monocitos y los linfocitos T con las células endoteliales y musculares lisas de la pared arterial.

La probabilidad de desarrollo de aterosclerosis es determinada por una combinación de factores de riesgo adquirido y hereditario. De forma concertada, producen lesiones de íntima llamadas ateromas, que protruyen hacia las luces vasculares. Una placa de ateromatosa corresponde a una lesión elevada, con un núcleo lipídico grumoso blando. (Principalmente de colesterol o de

ésteres de colesterol) con una cubierta fibrosa.

Las lesiones formadas por aterosclerosis son de 3 tipos: la estría grasa, la placa ateromatosa fibrosa y la lesión complicada. Las últimas dos 2 causantes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Las lesiones complicadas más avanzadas incluyen hemorragias, ulceración y depósitos de tejido cicatricial. La trombosis es la principal complicación de la aterosclerosis; la causa es el enlentecimiento y turbulencia del flujo sanguíneo en la región de la placa y la ulceración de la placa. En trombo puede ocluir un vaso pequeño en el corazón y el cerebro.⁴

Una anomalía que se puede detectar muy pronto en los vasos sanguíneos que acaban con una aterosclerosis es la lesión del endotelio vascular. Una vez que ocurre el daño del endotelio vascular, empiezan a acumularse en la zona de lesión los monocitos y los lípidos circulantes (en su mayoría LDL).

Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo para la aterosclerosis es la hipocolesterolemia, que puede modificarse. Otros factores de riesgo como el avance de la edad, el antecedente familiar de CPC prematura, el sexo masculino, que no puede modificarse. La tendencia al desarrollo de la aterosclerosis parece tener un carácter familiar.

Los trastornos del metabolismo de lipoproteínas son conocidos en forma global como “dislipidemias” y se caracterizan clínicamente por mayores concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos o ambos, que se acompaña en grado variable de menores concentraciones de colesterol de HDL. La mayor parte de los sujetos con dislipidemias muestran alguna combinación de predisposición genética. Muchos pacientes con dislipidemias no todos, están expuestos a un mayor riesgo de ASCVD, y es la razón fundamental para plantear el diagnóstico, porque cualquier intervención puede disminuir dicho riesgo.⁴

Dislipidemia

Alteraciones en la estructura y el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas o vehículos encargados del transporte de los lípidos en la circulación. Actualmente la biología molecular permite definir las como una expresión anormal de los genes que codifican proteínas responsables del metabolismo de los lípidos en circulación.⁵

Clasificación de las dislipidemias

Las dislipidemias pueden clasificarse de acuerdo al fenotipo de lipoproteínas presentes, según su origen o por su etiopatogenia.⁶

Ácido cafeico y sus generalidades

El ácido cafeico es el ácido hidroxicinámico de mayor distribución en la naturaleza. Los

hidroxinámicos pertenecen al grupo de compuestos fenólicos simples (C3-C6) que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (OH). Algunos ejemplos pueden ser ácido cafeico (3,4-dihidrocinámico), ácido ferúlico, ácido p-cumarínico, ácido sináptico y ácido clorogénico.

Los compuestos fenólicos de las plantas tienen dentro de sus propiedades las de ser antioxidante, ejercer efectos quelantes y modular la actividad de varios sistemas enzimáticos, actuando en su mayoría en la dieta, como elemento que promueven la salud ante factores químicos y físicos estresantes para el organismo.

Los ácidos clorogénico, ferúlico y cafeico tienen propiedades antioxidantes *in vitro*, que pudieran contribuir a la prevención de enfermedades

cardiovasculares. Investigaciones *in vitro* han revelado que el ácido cafeico y otros compuestos fenólicos como los ácidos sináptico o ferúlico, incubados en presencia de LDL, incrementan la protección de estas lipoproteínas contra la oxidación con la relación cafeico > sináptico > ferúlico.

Los antioxidantes pueden prevenir o retardar la oxidación de un sustrato biológico, y en algunos casos revertir el daño oxidativo de las moléculas afectas.⁶

Según el mecanismo de acción, se clasifican en:

- Antioxidantes Preventivos: al comienzo de una cadena de oxidación (reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos) ejemplo: enzimas, glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa.
- Antioxidantes secundarios: bloqueando en alguna etapa de la cadena de oxidación, una vez iniciada, captando radicales libres. Ejemplo: vitamina E y C enzimas superóxido dismutasa.

Como se ha mencionado anteriormente, cuando reaccionan los radicales libres de ácidos grasos poliinsaturados entre sí se puede formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclizarse, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana.

La alteración en la permeabilidad de la membrana implica que ésta permita la entrada de diversos solutos a las células sin ningún control, pero principalmente permite la entrada de agua por osmosis, lo cual hincha a la célula hasta el extremo de hacerla reventar y con ello causar su muerte. Este tipo de muerte se conoce como necrosis. Cuando la célula estalla, vacía todo su contenido sobre las células vecinas iniciando de esta manera la respuesta inflamatoria, proceso que se ha asociado a una gran cantidad de patologías.⁷

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) presentes en las LDL son especialmente sensibles a la oxidación. Su peroxidación lipídica presenta las mismas características generales descritas en los procesos oxidantes que ocurren en los lípidos de las membranas. Así, la cadena de reacciones puede iniciarse con la sustracción de un electrón de uno de los AGPI presentes en las LDL, lo cual origina un hidroperóxido lipídico o un peróxido de hidrógeno lipídico que puede descomponerse, en presencia de iones metálicos, en un radical alcóxido o peróxido o en el radical hidroxilo, respectivamente.

En el estudio llamado Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS), se obtuvieron resultados a favor de la hipótesis de que los antioxidantes que inhiban la oxidación de las LDL pueden reducir la incidencia de eventos coronarios.⁸

Discusión y resultados

Preparación de materias primas y origen.

Pulpa deshidratada Origen: Finca Santa Lucía, La Palmita, Zarcero. Preparación: Moler en licuadora hasta conseguir textura fina.

Café verde Origen: Finca Santa Lucía, La Palmita, Zarcero. Preparación: Moler en licuadora hasta conseguir textura fina.

Cápsulas Lipoless del Maná Origen: Macrobiótica Preparación: extracción del polvo de las cápsulas.

Método I: Extracción de los compuestos y liofilizado.

En esta etapa se realizó la extracción en caliente y liofilizado, según lo investigado en la literatura, se indica que a mayores temperaturas se logra una optimización de la extracción del ácido cafeico, pues se trata de la temperatura para que haya una mayor capacidad de disolución en el medio acuoso. Además, lo obtenido por el método de liofilización involucra un proceso de deshidratación donde los compuestos aumentan su concentración y mantienen la totalidad de sus propiedades.

Procedimiento de extracción de las muestras.

Se pesó en la balanza analítica 8g de café verde en un beaker de 250 mL. Luego se añadió 240ml de agua destilada junto con la pastilla de agitación. Posteriormente se calentó a una temperatura hasta ebullición y agitación constante (para aumentar solubilidad). Luego de 25 minutos donde se observó los vapores, se retiró de la plantilla hasta que estuviera frío, se centrifugó y por último se decantó en un beaker para ser liofilizado. El proceso se realizó con las tres muestras de la misma manera.

Espectrofotometría ultravioleta

Se diluyó una cantidad considerable de la muestra con agua. Para dicha prueba se utilizó

el equipo de Perkin Elmer Lambda 25 UV. Se colocaron las muestras en la cubeta limpia y sin trazas de ninguna otra muestra, ajustando la longitud de onda de Perkin Elmer Lambda 25 UV y se leyeron cada una de las muestras para obtener su respectivo espectro.

Método II: Cuantificación de los compuestos

Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Método de HPLC para cuantificar concentración del ácido cafeico en muestra de café verde, pulpa y semillas del mana (extraída en caliente/liofilizada)

Procedimiento (preparación de la muestras)

Se pesó 0,2000g de la muestra en un beaker de 150mL. Luego se agregó 50 mL de agua destilada a un balón de 100 ml con la muestra ya pesada. Se colocó el beaker en una plantilla y se agrega la pastilla magnética de 240 rpm. Se calentó hasta observar vapores y a partir de ahí se esperó 5min. Posteriormente se transvasó cuantitativamente, en caliente, utilizando un embudo y un agitador de vidrio a un balón de 100 ml. Se realizaron 3 lavados al embudo y el agitador de vidrio para evitar pérdida de muestra, añadiendo 10 ml de metanol a la muestra, Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y una vez

que alcanzó la temperatura ambiente se lleva a la línea de aforo con agua destilada que se encuentre en las mismas condiciones de temperatura. Este proceso se realizó tres veces, una vez para cada muestra.

Procedimiento (preparación del patrón)

Se pesó aproximadamente 0,100g de ácido cafeico en balones de 100ml, agregando agua destilada sin llegar a la línea de aforo, luego se agregó metanol hasta disolver el patrón (20 ml para ácido cafeico), una vez disueltos, se llevó a la línea de aforo con agua destilada. Se tomó una alícuota de 5mL del patrón y transvasarlo a un balón de 50mL y se aforó con agua destilada. Se rotuló el vial para patrón y para la muestra, se realizó lavados a las jeringas, se colocó el micro filtro y se transvasó una pequeña cantidad del patrón y muestra de los viales correspondientes.

Por último se guardó el patrón concentrado y la muestra para entregar a los asistentes de laboratorio.

Preparación de cápsulas.

Para la realización de la forma farmacéutica, se utilizó el extracto de semilla verde de café que posee ácido cafeico y celulosa microcristalina.

Las cápsulas poseen un tamaño 0 por lo tanto su capacidad es de 400mg a 800mg.

Las cápsulas poseen 200mg de ácido cafeico y 200mg de celulosa microcristalina.

Dosis

Tomar una cápsula cada 12 horas.

Resultados y discusión

Evaluación Espectros UV-Visible

Al analizar las muestras por medio de espectrofotometría de UV se identificó claramente la presencia de ácido cafeico, y los resultados muestran longitudes de onda correspondientes a lo que indica la literatura, donde el ácido cafeico absorbe a una longitud de onda 320 nm.

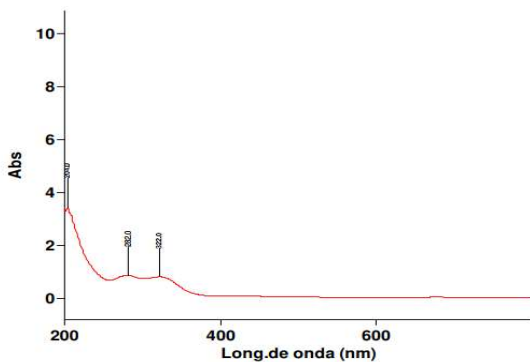


Figura 2. Imagen ultravioleta de muestra de pulpa de café

Fuente: Elaboración propia con datos de análisis de espectrofotometría ultravioleta

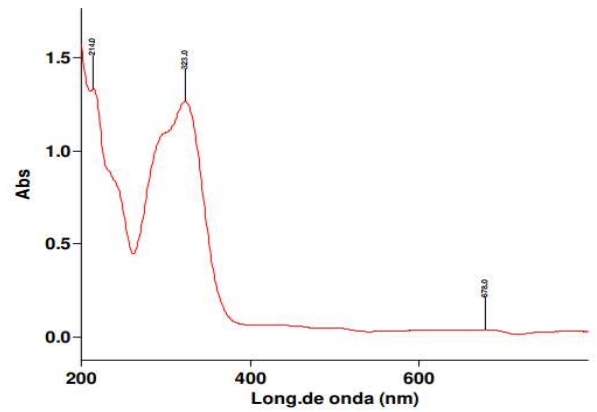


Figura 3. Imagen ultravioleta de muestra de cápsulas a base de ácido cafeico

Fuente: Elaboración propia con datos de análisis de espectrofotometría ultravioleta

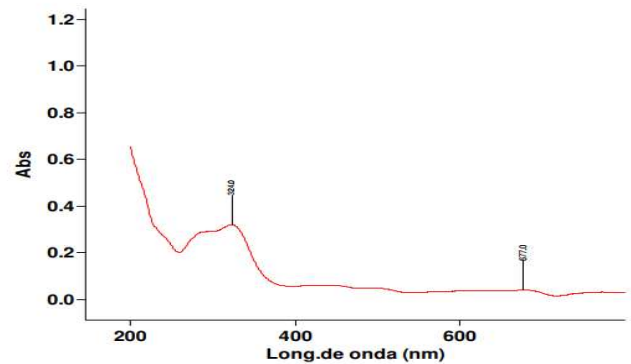


Figura 4. Imagen Ultravioleta de muestra de café verde

Fuente: Elaboración propia con datos de análisis de espectrofotometría ultravioleta

Evaluación espectros IR

Resultados de espectro Infrarrojo en patrón de ácido cafeico Se identificaron las siguientes bandas, correspondientes a las muestras patrón de ácido cafeico, estas se muestran en **figura 5**.

- En el rango 3423,9 cm⁻¹ se observa la banda de O-H de fenol
- En el rango de 2916,0cm⁻¹ y 2849,6 cm⁻¹ se observa el grupo alquil
- En el rango de 1731,7cm⁻¹ se observa la banda del éster.
- En 1615,9 se encuentra la banda del enlace C=O
- En 1113,3 se encuentra la banda del enlace C-O
- En el rango de 893,7 y 814,5 se puede observar la banda de los aromáticos

Los resultados del espectro infrarrojo de todas las muestras utilizadas siguieron este mismo patrón con referencia a las bandas y los diferentes grupos, excepto en la de las cápsulas del mercado ya que estas poseen celulosa microcristalina por lo tanto las bandas se translanan.

Evaluación de los resultados de HPLC.

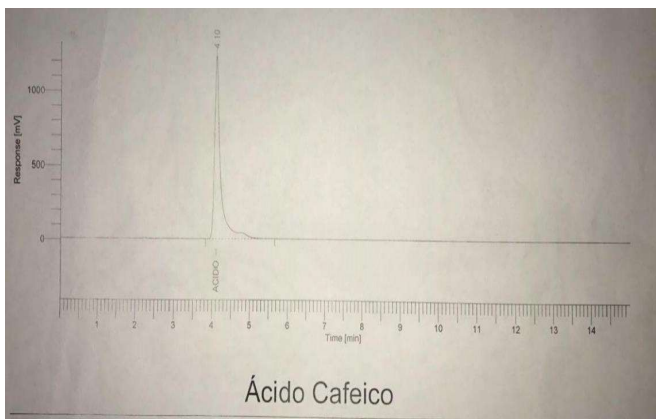


Figura 6. Análisis de HPLC patrón de ácido cafeico.

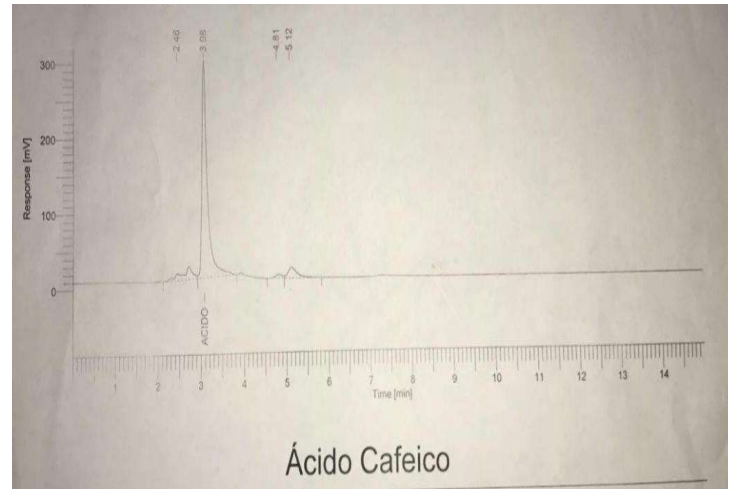


Figura 7. Análisis de HPLC en pulpa de café Fuente: Elaboración propia

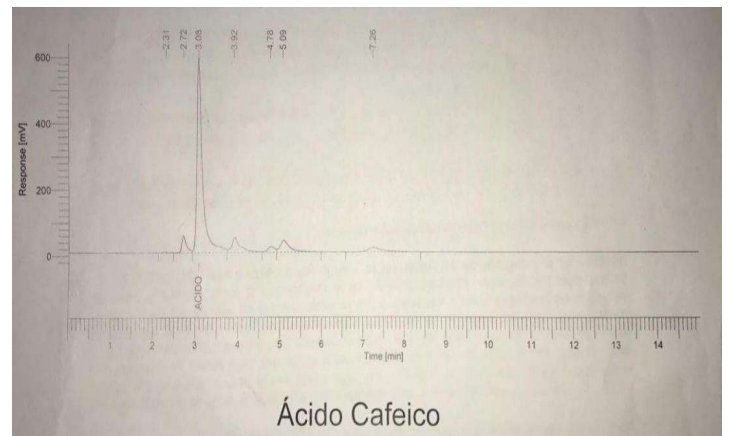


Figura 8. Análisis de HPLC en semilla de café verde Fuente: Elaboración propia

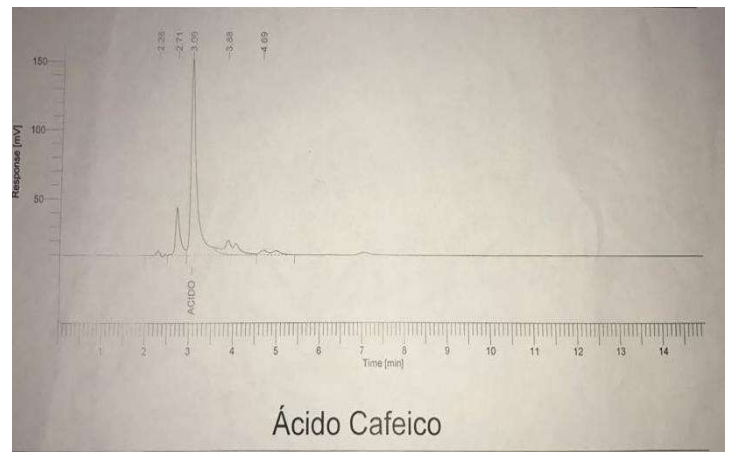


Figura 12. Análisis HPLC en cápsulas Fuente: Elaboración propia

Mediante los resultados con HPLC se puede decir que el corrimiento que presentan las bandas de las muestras respecto al patrón se justifican porque la molécula se protona y pierde agua, en medio ácido y caliente la molécula de ácido cafeico tiende a ciclarse, habiendo un reordenamiento molecular.

Tanto las interpretaciones de los cromatogramas de HPLC, como la justificación de los picos de absorción de los infrarrojos se respaldan precisamente porque la molécula de ácido cafeico en medio ácido cicliza y se debe considerar que el patrón de referencia, está como la sal iónica del ácido cafeico por lo tanto ella va a tener un recorrido diferente en cromatografía líquida de alta resolución con un tiempo de retención 4.08 min y no así de las moléculas ácidas en presencia de una fase móvil de ácido acético y a las temperaturas que genera el aparato que hacen irremediablemente que se dé el reordenamiento descrito.

Conclusiones

- Es bastante complicado que los radicales choquen unos con otros y sean capaces de generar una estructura reactiva y por ende, el ácido cafeico dada su naturaleza química al presentar en su conformación grupos bencenilos y enlaces dobles, esta molécula tiene gran capacidad para captar radicales libres y desplazarlos.

- La formación de la placa ateromatosa posterior a los efectos por lesión endotelial provocados por la tensión de corte, depende de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y es por ello que se podría vincular esta actividad como uno de los pasos limitantes en la fisiopatología de la aterosclerosis.
- El uso de principios naturales como el ácido cafeico promueve la extensión de la salud a todos los estratos pues minimiza el costo en la obtención de productos farmacéuticos de calidad y garantiza políticas de extensión sanitaria y mejoran, de esta manera, la calidad de vida la población a partir de un incremento positivo en los indicadores de salud.
- Mediante esta investigación se determinó que la semilla del café y su variedad es un factor importante de interpretación de las posibles cantidades a obtener por métodos de extracción.

Recomendaciones

- Involucrar más estudios sobre el ácido cafeico utilizando otros recursos científicos técnicos para establecer nuevas capacidades dentro del campo de la terapéutica.
- Aplicar los estudios sobre el ácido cafeico como antioxidante de manera

que pueda replantearse su uso en otras afectaciones relacionadas con la formación de radicales libres.

- Auspiciar el uso de este y otros compuestos antioxidantes como parte de un tratamiento coadyuvante en el manejo del desarrollo de la aterosclerosis, sin sustituir, otras medicaciones.

Referencias Bibliográficas

- 1¶ McKee T, Mckee J. las bases moleculares de la vida. 5th ed. China: Mc Graw Hill; 2013.
- 2¶ Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Bioquímica. Barcelona: Reverté ; 2011
- 3¶ Grossman S, Mattson Porth C. Fisiopatología: alteraciones de la salud, conceptos básicos. 9th ed. China: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
- 4¶ Guyton A, Hall J. Guyton & Hall, tratado de fisiología médica. 13th ed. Barcelona: Elsevier España ; 2016.
- 5¶ Kasper D, Harrison. Principios de medicina interna. 19th ed. Mexico D.F.: McGraw- Hill Educación; 2016.
- 6¶ Flores J. Farmacología humana, 4^{ta} ed. Masson 2003.
- 7¶ Konigsberg Fainstein M. Radicales libres y estrés oxidativo. México, D.F.: Manual Moderno; 2008.
- 8¶ Pérez Y. Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis [Internet].
- 9¶ Arias L, Marín G. Atención farmacéutica y los antioxidantes (ácidos caféico) como acción preventiva del cáncer de mama [Tesis]. San José, Costa Rica Editorial; 2012.

