

## OBTENCIÓN DEL GLUCÓSIDO FLAVONOIDE GOSSYPITRINA DE LOS PÉTALOS DE LAS FLORES DE *Talipariti elatum* s.w. Y EVALUACIÓN DE SU POSIBLE EFECTO ANTIOXIDANTE

### ISOLATION OF THE GLUCOFLAVONOID GOSSYPITRIN FROM THE FLOWERS OF *Talipariti elatum* s.w. AND THE EVALUATION OF ITS ANTIOXIDANT ACTIVITY

CUÉLLAR-CUÉLLAR, ARMANDO<sup>1\*</sup> Ph.D., GONZÁLEZ-YAQUE, JOSÉ<sup>2</sup> M.Sc.

<sup>1</sup>Profesor Departamento de Farmacia, Universidad de La Habana, Cuba. <sup>2</sup> Profesor del Instituto Superior Politécnico de la Enseñanza Profesional (ISPETP) Ciudad de La Habana, Cuba.

\*Contacto: [mandyc@infomed.sld.cu](mailto:mandyc@infomed.sld.cu)

Recibido: 06-08-2010; Aceptado: 16-10-2010

#### Resumen

Gossypitrina es un O-glucósido en C<sub>7</sub> de un flavonoide con hidroxilos en 3, 5, 8, 3' y 4'. Su aislamiento se ha descrito de las flores de muchas especies de plantas. Los procesos extractivos utilizan una extracción generalmente con etanol y columnas cromatográficas de sílica gel o Sefadex LH- 20 para la purificación. No se han descrito posibles usos para esta molécula. Se desarrolla un procedimiento de extracción que permite la cristalización selectiva de este flavonoide utilizando el 1,2 di metoxi-etano como disolvente, en rendimiento de hasta un 3% en peso de los pétalos de las flores de *Talipariti elatum* s.w, los cuales se utilizan como antiasmáticos por la medicina tradicional en Cuba, demostrando además la carencia de toxicidad de esta molécula y su posible efecto antioxidante por un método de ensayo establecido y por su poder de formar quelatos frente a los iones hierro y cobre, los cuales se relacionan con el efecto antioxidante "in vivo". Todo esto fundamenta su posible efecto terapéutico y justifica el uso que se le infiere por la medicina tradicional en Cuba a las flores de la especie.

**Palabras clave:** *Talipariti elatum* s.w., efecto antioxidante, Gossypitrina

#### Abstract

Gossypitrin is an O glucoside in C<sub>7</sub> position of a flavonoides with OH substitutions in 3, 5, 8, 3' and 4'. It has been isolated from different plant species. The procedures use ethanol for extraction and chromatographic columns of Silica or Sephadex LH-20 for the isolation and purification. No biological activity has been described for this natural product. In the present study 1-2 dimethoxy-ethane is used as selective solvent yielding around 3 % of the glucoside. The flowers are used in Cuba in Traditional Medicine as antiasthmatic. Acute toxicity is evaluated; the antioxidant activity and the possible mechanism of this activity showing the capacity of binding to iron and copper ions wich catalyze the production of ROS "in vivo". Those results

suggest that the possible biological activity is because and antioxidant way of action.

**Key words:** *Talipariti elatum* s.w., antioxidant activity, Gossypitrin.

## Introducción

La Gossypitrina es un flavonoide O-glucósido en la posición 7 de la estructura típica de un flavonoide polihidroxilado en las posiciones 3, 5, 8, 3' y 4' además de la posición 7. Se ha aislado de diversos tipos de flores aunque en las especies del género *Hibiscus* es donde se ha encontrado su prevalencia de aparición junto con la antocianidina roja que produce una asociación con este flavonoide que se conoce como efecto de copigmentación por lo que generalmente aparecen asociados en los extractos de dichas flores (DANGLES *et al.*, 1993).

Esta molécula no tiene informes sobre posibles efectos biológicos en la literatura consultada y en particular no ha sido evaluada como una molécula con posible efecto antioxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Solo tiene informado un efecto antioxidante para el ácido protocatético presente en las flores del género *Hibiscus* (TSUI-HWA *et al.*, 1996).

En Cuba hay dos especies de plantas conocidas por "majagua", *Hibiscus tiliaceus*, árbol pequeño y ramoso y la majagua común o majagua azul, árbol que alcanza hasta cerca de 20m de altura que corresponde al *Talipariti elatum* s.w. especie considerada endémica; sus flores en Cuba son muy apreciadas por la medicina tradicional como expectorantes y antiasmáticas (ROIG, 1988).

La especie que crece en Cuba no tiene estudios químicos o biológicos que describan su composición en cuanto a metabolitos secundarios o que confirmen su posible uso, aunque si otras especies del género *Hibiscus* estudiadas donde se describe como uno de los componentes la Gossypitrina. Para su aislamiento, se realiza una extracción de las flores completas con etanol, el residuo de extracción se reparte en disolventes tales como éter di etílico, cloroformo y acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se purifica en columnas de sílicagel con mezclas de acetato de etilo y metanol en un gradiente ascendente de polaridad, lo cual permite cristalizar entre otros la Gossypitrina en rendimientos que oscilan alrededor del 0,1% (NAIR *et al.*, 1961; SANKARA *et al.*, 1961; LOWRY, 1976).

*Talipariti elatum* s.w. es un árbol muy común en toda la isla que florece generalmente en dos períodos del año. Sus flores inicialmente amarillas, cambian su color a naranja y rojo antes de caer de la planta. Estas flores completas, se utilizan por la población en forma de decocción o fermentadas en forma de un vino con fines expectorantes y antiasmáticos (ROIG, 1988).

En nuestro país, existen dos preparaciones que se comercializan con estos fines IMEFASMA y FLORMAJ a partir de extractos totales de las flores completas de la especie, sin demostrar quien o quienes son los componentes químicos responsables de estos usos de la medicina tradicional ni cual es su verdadero efecto farmacológico. Este hecho es el problema científico que se pretende justificar a partir de la presente investigación pues es necesario validar farmacológicamente y con el establecimiento del posible principio activo responsable del efecto que se valida, ya que la medicina tradicional cuando se traslada a su uso como medicina alternativa debe tener una justificación científica y total certeza de no toxicidad para una mayor seguridad en su uso por la población. En nuestro país se trabaja aceleradamente en esta vía para que los productos alternativos que se comercialicen cumplan con estos requerimientos de calidad.

## **Materiales y métodos**

### **Método de extracción 1.**

100g de pétalos de *Talipariti elatum* s.w., secos y triturados, se colocaron en un frasco de cristal, se humectaron con 300mL de 1,2 dimetoxietano y se completó el volumen de disolvente hasta 1L. Se dejó en maceración 24h al cabo de las cuales se calentó la mezcla en baño de agua durante 15min y se filtró en caliente. Se separó el extracto y la planta residual se sometió al mismo proceso de extracción cuatro veces más. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación hasta un volumen aproximado de 200mL. Se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo-naranja abundante que se recuperó por filtración en frita de vidrio poroso # 3.

### **Método de extracción 2.**

100g de pétalos de *Talipariti elatum* s.w., secos y triturados, se colocaron en un cartucho de un equipo Soxhlet y se extrajeron durante 12h con 700mL (en el balón del equipo) de 1,2 dimetoxietano. El líquido de extracción se procesó de la misma forma que el anterior.

### **Método de extracción 3.**

100g de pétalos de *Talipariti elatum* s.w., secos y triturados, se colocaron en un frasco de cristal, se humectaron con 300mL de metanol o etanol y se completó el volumen de disolvente hasta 1L. Se deja en maceración 24h al cabo de las cuales se calienta en baño de agua durante 15min y se filtró en caliente. Se separó el extracto y la planta residual se sometió al mismo proceso de extracción tres veces más. Los líquidos orgánicos de extracción se concentraron por destilación hasta un volumen aproximado de 50mL. Se

añadió cuatro veces este volumen de 1,2 dimetoxietano y se refrigeró. El proceso se continuó de forma semejante a los anteriores.

#### **Método de extracción 4.**

100g de pétalos de *Talipariti elatum* s.w., secos y molidos, se colocaron en un cartucho de un equipo Soxhlet y se extrajeron durante 12h con 700mL (en el balón del equipo) de metanol o etanol. El líquido de extracción se procesó de la misma forma que los anteriores.

#### **Recristalización.**

El producto crudo obtenido se redisolvió en la mínima cantidad de metanol o etanol en caliente. Se adicionó cuatro veces el volumen de 1,2 dimetoxietano y se refrigeró hasta la aparición de un sólido amarillo claro. El sólido se recuperó por filtración con una eficiencia del 87-92% de rendimiento del producto recristalizado. La Gossypitrina así obtenida se destinó para el análisis estructural y los ensayos biológicos realizados.

#### **Toxicidad aguda.**

El ensayo de toxicidad aguda se llevó a cabo según el método de la Clase Tóxica Aguda regulado por la OECD en su norma N° 423 de 1996. Se utilizaron seis ratas jóvenes adultas (tres hembras y tres machos) con un intervalo de peso corporal entre 150 y 200g, a los cuales se les retiró el alimento 18h antes de la administración, manteniéndoseles el libre acceso al agua. Los animales se pesaron al inicio, semanalmente y al final del ensayo. Se preparó una solución en agua recién destilada de la sustancia de prueba que permitió la administración de una dosis fija de 2.000mg/Kg. Se utilizó un volumen de solución de 2mL/100/g de peso corporal. Las ratas se observaron constantemente durante las primeras 24h, continuando la observación diariamente durante un período de 14 días.

Se tuvo en cuenta la letalidad y se registró cualquier signo de toxicidad reflejado por cambios en la piel, en ojos y en membranas mucosas, en el sistema respiratorio, nervioso central y autónomo, en la actividad somato motora y en la conducta; prestándose atención a: temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Al finalizar el período de observación se procedió al sacrificio por inhalación de éter di etílico para realizarles la autopsia, efectuándose un examen macroscópico minucioso de órganos y tejidos tales como: corazón, pulmón, riñones, bazo, estómago y órganos genitales. La sustancia de ensayo se clasificó de acuerdo a su toxicidad según los parámetros establecidos por la Comisión de la Comunidad Europea, 1992 (Tabla 1). Los ensayos se realizaron en el centro de estudios biológicos

adscrito al IFAL que es el centro que en el país está acreditado para la realización de este tipo de experimentos

**Tabla 1.** Sistema de clasificación para el ensayo de Toxicidad Aguda Oral.

Clase	Interpretación	Clasificación
CTA <sub>0</sub>	Mortalidad > 2000	No clasifica como tóxico
CTA <sub>1</sub>	200 < Mortalidad ≤ 2000	Dañino
CTA <sub>2</sub>	25 < Mortalidad ≤ 200	Tóxico
CTA <sub>3</sub>	Mortalidad ≤ 25	Muy tóxico

CTA = clase tóxica aguda.

Fuente: Commission of the European Communities. (1992). J Eur Comm. L 383 A. 35:110-112.

### Evaluación del poder antioxidante total.

#### Cación Radical ABTS<sup>•+</sup>

El ensayo para medir el poder antioxidante total se realizó de acuerdo al método RE (1999).

#### Efecto de la Gossypitrina sobre la peroxidación lipídica (POL) inducida por CCl<sub>4</sub> *in vitro*.

Para la realización del estudio *in vitro* las ratas se anestesiaron con tiopental (40mg/Kg) y se perfundieron a través del hígado. Después de la perfusión, los hígados se extrajeron y se homogenizaron.

La POL se indujo por incubación de los homogenados de hígado con diferentes concentraciones de CCl<sub>4</sub>. La concentración que indujo una extensión apropiada de POL se seleccionó para incubar alícuotas de homogenados por diferentes tiempos para determinar el tiempo de incubación óptimo. Después de la incubación, los homogenados se centrifugaron y el sobrenadante se utilizó para medir MDA como un índice de la POL a través del kit de Bioxytech LPO-586, Cayman Chemical Co. Ann Arbor, USA) usando una reacción colorimétrica (586nm), la cual utiliza 1-methyl-2-phenylindol como cromógeno.

#### Efecto de la Gossypitrina sobre la per oxidación lipídica (POL) inducida por CCl<sub>4</sub> *in vivo*.

**Tratamiento con CCl<sub>4</sub>:** Se empleó una solución de CCl<sub>4</sub> al 20% en aceite vegetal, a razón de 1mL/Kg de peso corporal durante 24h. La vía de administración fue la intraperitoneal, *ad libitum*.

**Tratamiento con el flavonoide:** se utiliza una concentración del flavonoide de 0,98mg/mL disuelta en agua recién destilada a razón de 5,97mg/Kg de peso corporal. La vía de administración fue la vía oral.

**Procesamiento del material:** si finalizar el tratamiento los animales se sacrificaron y se les extrajo el hígado el cual se homogenizó para llevar a cabo las determinaciones bioquímicas.

### **Efecto quelante sobre diferentes iones metálicos.**

Con la Gossypitrina obtenida por recristalización, se determinó su poder quelante frente a diferentes iones, lo cual complementa la justificación experimental del efecto antioxidante que se estudió.

Se trabajó con una disolución de partida de los diferentes iones al 0,1% en agua destilada. A partir de esta solución se realizaron diluciones lineales del 25% hasta encontrar la dilución límite que desarrolló color con una disolución de 0,98mg de Gossypitrina en cada mL de agua destilada de partida.

La reacción visual se realizó con 1mL de las diferentes disoluciones de los iones de los siguientes metales: Plomo (Pb), Potasio (K), Sodio (Na), Amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), Calcio (Ca), Berilio (Be), Aluminio (Al), Magnesio (Mg), Zinc (Zn), Cobalto (Co), Cerio (Ce), Plata (Ag), Hierro (Fe) y Cobre (Cu) y una gota de la disolución del flavonoide.

La reacción de quelación se corrobora por espectrofotometría UV-Visible.

### **Resultados y discusión**

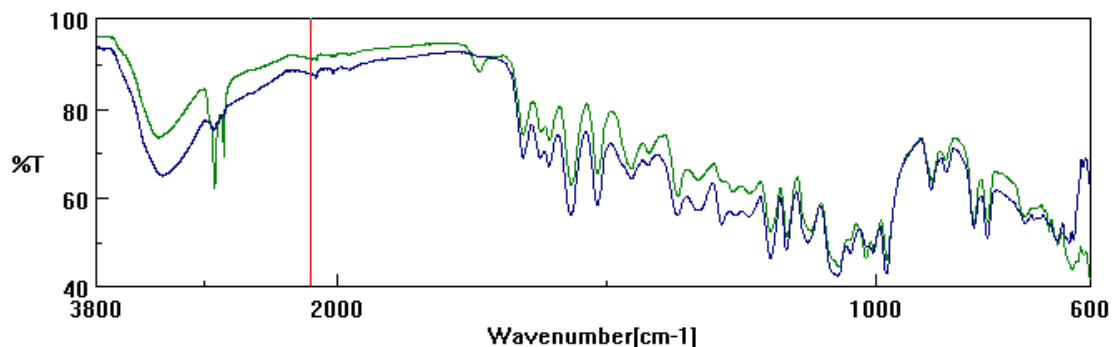
La Gossypitrina cruda se obtiene en un rendimiento aproximado de un 3% en peso de los pétalos de la planta de partida.

Este rendimiento es alto comparado con otros tipos de productos naturales y está determinado por el uso selectivo de los pétalos de las flores pues en el cáliz, pistilo y/o polen no se ha detectado la presencia del flavonoide y utilizando solo los pétalos se obtiene un producto más puro y en mayor rendimiento.

### **Caracterización de la Gossypitrina aislada.**

Punto de fusión: 183,5-185<sup>0</sup>C.

A continuación en la Fig. 1 se muestran los espectros infra rojos (IR) de los productos aislados (verde: producto crudo, azul: producto recristalizado)



**Figura 1:** Espectro IR comparativo para los productos aislados

Se observan bandas a  $3375\text{cm}^{-1}$ ,  $3000\text{-}2980\text{cm}^{-1}$ ,  $1656\text{cm}^{-1}$ ,  $1610\text{-}1519\text{cm}^{-1}$  y  $1200\text{cm}^{-1}$  para ambas Gossypitrinas lo cual demuestra que el producto crudo tiene un grado de pureza bastante similar al producto recristalizado y que estas bandas responden a los agrupamientos químicos fundamentales de este tipo de producto químico, por lo que pueden utilizarse indistintamente para los fines estudiados.

#### **Masa.**

$M^+318$ ,  $M/Z$  302,  $M/Z$ 152-154,  $M/Z$  73

Este espectro corresponde al aglicón, utilizando el método FAB es posible obtener la masa molecular correspondiente al glucósido que se corrobora por RMN.

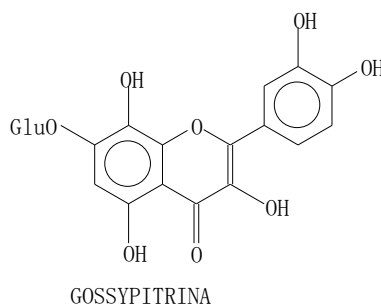
#### **RMN $H^+$**

3,1ppm, 3,9ppm (CH y OH), 4,85ppm glucosa, 5,1ppm (OH fenoles), 9,42ppm (OH enol), 6,25-8,1ppm (H aromáticos)

#### **RMN $C^{13}$**

60-98ppm carbonos de glucosa, diez carbonos cuaternarios y las señales de 15 carbonos de un flavonol. Todos los datos físicos y espectroscópicos referidos coinciden con los informes para esta estructura (GONZÁLEZ-YAQUE, 2002). En el presente trabajo se demuestra la importancia de trabajar solo con los pétalos, pues en las demás partes de las flores no hay Gossypitrina pero si otros componentes como hidrocarburos (más de un 25%), ácidos grasos diversos de número par e impar de átomos de carbono,  $\beta$  sitosterol, carbohidratos y compuestos nitrogenados que interfieren en la purificación del glucósido flavonoide y hacen más complejos los procedimientos para obtener altos porcentos de rendimiento del mismo.

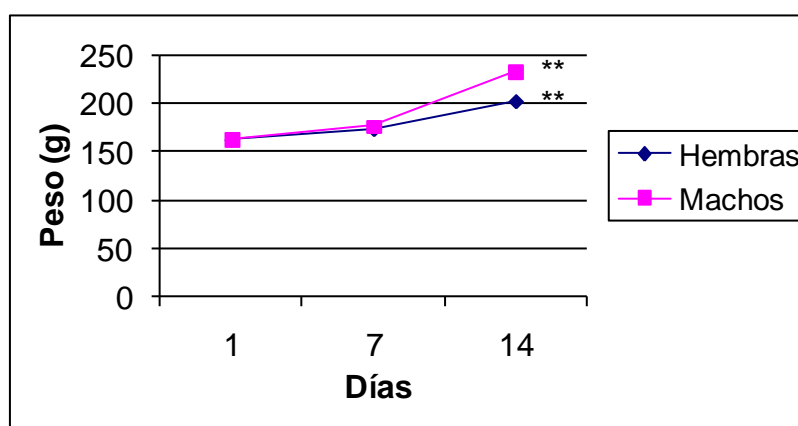
## Estructura.



## Evaluaciones biológicas.

En cuanto a las evaluaciones biológicas, la administración oral de Gossypitrina no provocó letalidad a la dosis empleada (2.000 mg/Kg) en los animales utilizados en el estudio de toxicidad aguda. Durante los 14 días de observación no se manifestaron signos tóxicos ni en la piel, ni en los ojos y membranas mucosas, así como tampoco en ninguno de los sistemas que se tuvieron en cuenta. No se evidenció presencia de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Tampoco se detectaron cambios patológicos a nivel macroscópico luego de la autopsia realizada a cada animal.

Por otro lado los animales no experimentaron retardo del crecimiento y el aumento de los pesos corporales se comportó de manera normal durante todo el tiempo que duró el estudio; encontrándose diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) en el peso de estos, para ambos sexos, entre el primer día y el último día del ensayo y a los siete días con respecto al día 14 (Fig. 2). Estos resultados hicieron que el flavonoide no clasifique como tóxico de acuerdo a lo referido en la Tabla 1.



**Figura 2.** Variación en el peso de los animales al inicio, a la semana y a las dos semanas de duración del ensayo

\*\* Diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los tiempos a los que se realizaron las mediciones dentro de los grupos de animales de un mismo sexo.



No se encontraron diferencias significativas ( $p>0,01$ ) entre el incremento en el tiempo del peso corporal de los animales en ensayo con respecto al comportamiento típico de animales de la misma especie, sexo y edad.

Los ensayos para evaluar el posible efecto antioxidante se realizó por el método que mide el poder antioxidante total y se comparó con la Quercetina. Los resultados fueron los siguientes:

**Ensayo del catión radical ABTS (TEAC).**

---Quercetina                      4,56mM

---Gossypitrina                    2,14mM

Se puede observar que el valor obtenido es el 50% del correspondiente al aglicón Quercetina, el flavonoide con mejor respuesta anti oxidante y el TEAC obtenido para la Gossypitrina esta al mismo nivel de la rutina, el glicósido flavonoide mas utilizado en la terapéutica clínica.

Por otra parte, con la Gossypitrina obtenida por recristalización a partir de alguno de los cuatro primeros ejemplos de ejecución descritos, se determina su actividad antioxidante frente a los radicales libres generados durante la peroxidación lipídica (POL), enzimática o no, a través de la medida de cantidad de malonildialdehído (MDA) que se produce el cual se hace reaccionar con el ácido tiobarbitúrico. La evaluación se realiza por un método “*in vitro*” y otro “*in vivo*”.

La Gossypitrina tiene efecto antioxidante inhibiendo la producción de DMA a una concentración de CI50 de 8,011 micro molar. Este valor es positivo aunque no es muy importante según la comparación con otros productos.

**Efecto quelante.**

La reacción que desarrolla una coloración verde intenso oscuro casi negro con el glucósido flavonoide y diferentes iones metálicos. No se observa visualmente L reacción con los siguientes iones: Plomo (Pb), Potasio (K), Sodio (Na), Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), Calcio (Ca), Berilio (Be), Aluminio (Al), Magnesio (Mg), Zinc (Zn), Cobalto (Co), Cerio (Ce), Plata (Ag), Hierro (Fe) y Cobre (Cu).

Resultaron positivos los iones:

Hierro (Fe) concentración límite visual de 0,0112%

Cobre (Cu) concentración límite visual de 1%

El ión hierro (Fe) es un ión importante en la producción de radicales libres por lo que su bloqueo va a favor de un efecto antioxidante de la molécula a través de un mecanismo de quelación de este metal.

La reacción visual se comprobó por el corrimiento de la banda I en un espectro UV (Tabla 2).

**Tabla 2.** Espectro UV de la Gossypitrina antes y después de la reacción con Fe

Gossypitrina	Después de la reacción
Banda II 287-289 nm	287-289 nm
Banda I 332 nm	375 nm Esta banda se corre.

Es evidente que su capacidad de quelar iones hierro ocurre a concentraciones tales que esta reacción puede ocurrir a nivel biológico. Esto puede explicar que el glucósido flavonoide pueda interferir en la reacción de Haber-Weis que ocurre a nivel biológico catalizada por los iones hierro y que produce varias especies reactivas de oxígeno que afectan los tejidos (ARUOMA, 1994)  $M^{2+} + O_2^- M^{(n-1)+} + O_2 \dots\dots M^{(n-1)+} + H_2O_2 M^{2+} + OH^- + HO\cdot$

Donde M= Fe

Este resultado, pudiera justificar, al menos experimentalmente que los pétalos de las flores de *Talipariti elatum* s.w. podrían utilizarse con fines terapéuticos sin ningún riesgo de toxicidad pues a la dosis máxima permitida de 2.000 mg/Kg no presenta ninguna reacción adversa en los animales de experimentación y además por su efecto demostrado en el presente trabajo, pudiera clasificarse como un antioxidante preventivo (secuestrador de metales). Por supuesto, se necesitan otras evaluaciones complementarias para asegurar su uso comercial con estos fines.

### Referencias.

ARUOMA, O.I. 1994. Nutritions and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd Chem.Tox.* 32(7):671-83.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. 1992. *J Eur Comm.* (L 383 A) 35:110-112.

DANGLES, D.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. 1993. Copigment association with anthocianins in plants. *Phytochemistry* 34(1):119-124.

GONZÁLEZ-YAQUE, J. 2002. *Estudio químico comparativo entre diferentes partes constitutivas de las flores de Tlipariti elatus S.W.* Tesis para el título de Máster en Química Farmacéutica. IFAL UH, Cuba.

- LOWRY, J.B. 1976. Floral anthocyanins of some Malasian Hibiscus species. *Phytochemistry* 15:1395-1396
- NAIR, A.G.R.; SUBRAMNIAN, S.; NAYARA-SWAMUN, S. 1961. Glycosides from flowers of *Hibiscus tiliaceus*. *J. Sci. Ind. Research* 20B:553-554.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. 1999. Modification of the TEAC method for DPPH assay. *Free Radic Biol Med.* 26:1231-1232.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J. 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive component of foods. *Biochemical Society Transactions* 34:790-794.
- ROIG, J.T. 1988. *Plantas Aromáticas, Venenosas y Medicinales de Cuba*. Editorial Científico Técnica, Habana, Cuba.
- SANKARA, S.S.; NARAYAMA, M.S. 1961. Pigments of the flowers of *Hibiscus tiliaceus*. *J Sci Ind Research* 20B:133-134.
- TSUI-HWA, T.; CHAN-JONG, W.; ERL-SHYH, K.; HIA-YIH, CH. 1996. *Hibiscus protocatechuic* acid protects against oxidative damage induce by tert butyl hydroxi peroxide in rat primary epatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 101:137-148.