

QUERCITRINA:

Un flavoide con actividad hipotensora, Obtenido del *Croton glabellus*

Beatriz E. Novoa*
Alix C. Céspedes*
Lucía A. de García**
Jorge E. Olarte C.**

Trabajo realizado en los Laboratorios de Fitoquímica y Farmacología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional, con los aportes del Departamento de Farmacia, Colciencias y el CINDEC (Consejo de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad Nacional).

INTRODUCCION

La comprobación de la acción medicinal de algunas plantas colombianas, es una de las líneas de investigación del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional. El estudio de estas plantas se ha enfocado tanto desde el punto de vista farmacológico, como desde el punto de vista químico. Una de las plantas escogidas inicialmente en este programa fue el *Croton glabellus*, porque es usada popularmente por su acción hipotensora (1) y además, porque es una planta ampliamente distribuida en los climas cálidos de Cundinamarca.

Investigaciones anteriores (2, 3) condujeron a establecer que contiene alcaloides, flavonoides y terpenos, y que la acción hipotensora es debida a la fracción de flavonoides aislada de la planta.

Estos resultados son interesantes pues, aunque actualmente los flavonoides no se usan en terapéutica, son objeto de estudio debido a las numerosas acciones biológicas que presentan.

En recientes investigaciones llevadas a cabo por Ruckstuhl y col. (4) se encontró que algunos flavonoides son inhibidores selectivos de las fosfodiesterasas de los nucleótidos cíclicos AMP y GMP. Dicha actividad está relacionada con la estructura del flavonoide como lo establecieron Beretz y col. (5) quienes mostraron que la acti-

vidad inhibitoria presenta el siguiente orden decreciente: Flavonoles, flavonas, antocianidinas, flavanonas, flavonoles y catequinas.

Cochet y col. (6) estudiaron el efecto "in vitro" de la quercetina y algunos compuestos químicamente relacionados con ella, sobre diferentes tipos de proteínas-quinasas y encontraron que inhibían solamente un tipo G de caseína quinasa. Los autores consideran que este efecto podría contribuir a la acción de los flavonoides sobre el metabolismo celular, particularmente en células malignas.

En estudios sobre inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas se encontró que flavonoides tales como: silibina, silidianina y silicristina inhiben la PG sintetasa del estómago de ratas, la cual convierte aproximadamente el 30% del ácido araquidónico en prostaglandina (7). El estudio de la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas es importante ya que estos compuestos en cantidades muy pequeñas producen un espectro muy amplio de actividades farmacológicas y la inhibición de su biosíntesis es reconocida hoy en día como el mecanismo de acción de algunos agentes antiinflamatorios (8).

Middelton y col. (9) demostraron que la quercetina inhibe la liberación de histamina inducida por antígenos y mitógenos. En experimentos "in vitro", por medio de electroforesis en papel, se estableció que la quercetina aumenta la capacidad de unión de la histamina con las proteínas plasmáticas especialmente las globulinas (10). La rutina, por el contrario, presenta efectos estimulantes en el curso del shock histamínico (11). En estudios llevados a cabo en animales de experimentación se observó que los flavonoides, especialmente la rutina, incluidos en la dieta alimenticia, aumentan la resistencia de los capilares de la piel (12, 13).

* Alumnos de tesis.

** Profesores Departamento de Farmacia.

La acción diurética de la planta *Spartium junceum* es debida al flavonoide escoparina, y la de la *Roseda luteola* a la luteolina (14). A diferencia de esta acción, la quercetina actúa como anti-diurético de una manera similar a como lo hace la vasopresina. Esta actividad parece estar relacionada con el aumento en los niveles de AMP cíclico (15).

Por medio de experimentos "in vitro" se logró establecer que la luteolina y la gossipina inhiben la reproducción del virus *Herpes hominis* (16).

La rutina y la gossipina reducen la úlcera gástrica de ratas inducidas con butadieno (17, 18). Igualmente, estos compuestos muestran efecto antiinflamatorio al ser ensayados en el edema plantar de ratas producido con carragenina (17).

Sharma (19), estudió el efecto de varias iso-flavonas, presentes en las legumbres, sobre el nivel de lípidos en ratas macho hiperlipidémicas y encontró que aquellas con grupos metoxilo como sustituyentes tales como biocanina, formononetina y protenseína poseen acción hipolipidémica.

Como se puede apreciar de la recopilación anterior, los flavonoides son potencialmente aplicables en terapéutica, pues ejercen acciones específicas en diversos sistemas. También es interesante anotar, cómo en algunos casos pequeñas variaciones estructurales conducen a efectos biológicos diferentes.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se enfocó al aislamiento e identificación del flavonoide que posee la acción hipotensora detectada en el extracto total y en la fracción de flavonoides.

PARTE EXPERIMENTAL

1. Material botánico

El material botánico fue recogido en mayo de 1979 en una zona comprendida entre Girardot, Tocaima y Agua de Dios, a una altura de 390 mts sobre el nivel del mar; luego secado a 40°C en una estufa de aire circulante, molido y almacenado en frascos protegidos de la luz y de la humedad. La recolección fue hecha por Luque y Paredes (3).

2. Aislamiento e identificación del flavonoide activo

2.1. Preparación de los extractos: 1 kg de material vegetal seco y pulverizado se extrajo exhaustivamente a reflujo con éter de petróleo. El residuo obtenido se extrajo en un Soxhlet con alcohol etílico del 96°, se filtró y se evaporó. Este extracto se denominó Eal.

Al extracto alcohólico se le añadieron 2 l de agua destilada y la mezcla se extrajo sucesivamente con cloroformo, acetato de etilo e isobutanol; obteniéndose los extractos Ecl, Eac y Eis. Estos extractos dieron prueba positiva para flavonoides con el reactivo de Shinoda.

2.2. Pruebas biológicas: Se practicó una hemodinamia en perro con los extractos Eal, Ecl, Eac y Eis evaporados a sequedad. Se le inyectaron intravenosamente: adrenalina, acetil-colina, los extractos antes mencionados disueltos en una mezcla etanol-agua (1:2); también se le inyectó esta mezcla. El extracto en acetato de etilo (Eac) fue el único que mostró actividad hipotensora. Los datos pertinentes y el registro aparecen en la Tabla I y en el Registro I respectivamente.

Tabla No. I

HEMODINAMIA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS PRELIMINARES

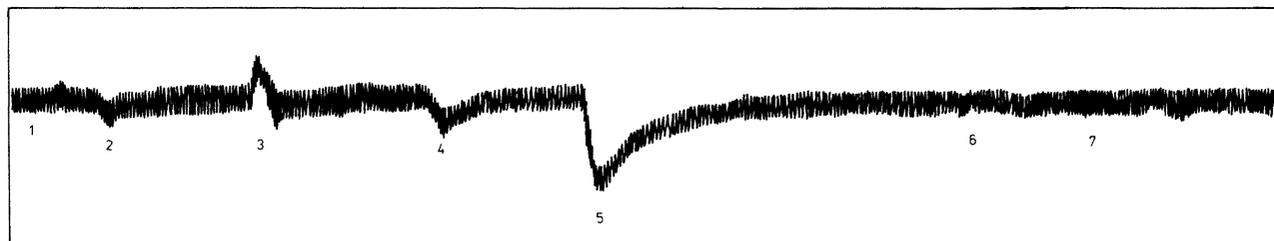
Animal de ensayo: Perro
Sexo: Macho
Peso: 15 Kgs.

Material ensayado	Concentración	Cantidad inyectada		Dosis	Reg.
		Vol.	Peso		
Adrenalina (Std.)	50 mcg/ml	25 unid. Insulina	15 mcg	1 mcg/Kg	3
Acetil Colina (Std.)	50 mcg/ml	25 unid. Insulina	15 mcg	1 mcg/Kg	2
Extracto etanólico total	43 mg/ml	20 unid. Insulina	10.75 mg	0.72 mg/Kg	4
Extracto clorofórmico	43 mg/ml	20 Unid. Insulina	10.75 mg	0.72 mg/Kg	7
Extracto acetato de etilo	43 mg/ml	20 Unid. Insulina	10.75 mg.	0.72 mg/Kg	5
Extracto isobutanólico	43 mg/ml	20 Unid. Insulina	10.75 mg	0.72 mg/Kg	6

NOTA: Los resultados de esta Tabla se encuentran en el Registro I.

REGISTRO I

ENSAYOS FARMACOLOGICOS PRELIMINARES



Animal: Perro
 Sexo: Macho
 Peso: 15 Kg.

1 - Registro normal
 2 - Acetil-Colina
 3 - Adrenalina
 4 - Extracto total
 5 - Extracto Acetato de etilo
 6 - Extracto Isobutanólico
 7 - Extracto Clorofórmico

2.3. Separación del flavonoide activo (FA): Al extracto Eac, se le hizo una cromatografía en capa delgada (ccd) preparativa (placas de 1 mm de espesor) en Sílica Gel G, usando como solvente acetato de etilo: acetona (8:2) y revelando un extremo de la placa con ferrocianuro de potasio al 1%: cloruro férrico al 1% (1:1). Las bandas obtenidas se rasparon, se extrajeron con metanol y con cada fracción se hizo una hemodinamia en perro.

Los datos y registros aparecen en la Tabla II y Registro II. Estos datos permitieron localizar el flavonoide con actividad hipotensora. La separación de este flavonoide se llevó a cabo a partir de Eac en una columna de Sílica Gel 60 (0.063 a 0.2 mm de diámetro de partícula), eluyendo con mezclas de acetato de etilo: acetona desde 95:5 hasta 80:20. El contenido de las

fracciones se controló por cromatografía en capa delgada y las fracciones iguales se reunieron. Se recogieron 3 grupos de fracciones, las cuales fueron probadas biológicamente por medio de una hemodinamia en perro. Sólo un grupo de fracciones mostró actividad.

2.4. Purificación de FA: El grupo de fracciones que mostró la actividad biológica se purificó por ccd preparativa en Sílica Gel G, desarrollando con cloroformo: metanol (8:2) y haciendo tres recorridos. Así se obtuvo un compuesto que cristalizó en metanol: agua (1:2) y mostró una sola mancha en cromatografía en capa delgada.

2.5. Identificación de FA.

2.5.1. Constantes físicas: sólido cristalino amarillo, Pf 176°C con descomposición, soluble en metanol y acetona, escasamente soluble en ace-

Tabla No. II

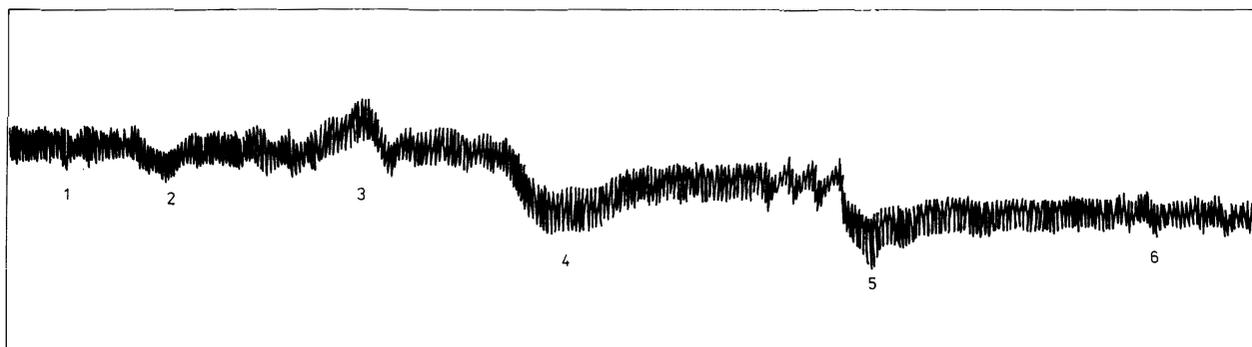
HEMODYNAMIA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS POR CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

Animal de ensayo: Perro
 Sexo: Hembra
 Peso: 11 Kg.

Material ensayado	Concentración	Cantidad inyectada		Dosis	Reg.
		Vol.	Peso		
Adrenalina (Std.)	50 mcg/ml	18 Unid. Insulina	11 mcg	1 mcg/Kg	3
Acetil Colina (Std.)	50 mcg/ml	18 Unid. Insulina	11 mcg	1 mcg/Kg	2
Fracción 1	11 mg/ml	73 Unid. Insulina	10 mg	0.90 mg/Kg	4
Fracción 2	11 mg/ml	73 Unid. Insulina	10 mg	0.90 mg/Kg	5
Fracción 3	11 mg/ml	73 Unid. Insulina	10 mg	0.90 mg/Kg	6

NOTA: Los resultados de esta Tabla se ilustran en el Registro II.

REGISTRO II
 ENSAYOS FARMACOLOGICOS DE LAS FRACCIONES
 DE LA CROMATOGRAFIA PREPARATIVA



Animal: Perro
 Sexo: Hembra
 Peso: 11 Kg

1. Registro normal
 2. Acetil-colina
 3. Adrenalina
 4. Fracción (1)
 5. Fracción (2)
 6. Fracción (3)

tato de etilo, etanol y agua caliente, insoluble en agua fría, éter y cloroformo.

2.5.2. Características espectroscópicas: El espectro U. V. presenta los siguientes máximos de absorción:

λ max en metanol 350, 300 (h), 263 (h), 256 nm
 λ max en metanol + NaOMe al 5% 393, 330 (h), 263 (h), 256 nm
 λ max en metanol + AlCl₃ al 5% 423, 327 (h), 304 (h), 273 nm
 λ max en metanol + NaOAc + H₃BO₃ 367, 298 (h), 260 nm.
 λ max en metanol + AlCl₃ al 5% + HCl conc. 400, 355, 299 (h), 272 nm.
 λ max en metanol + NaOAc (sólido) 374, 322 272 nm.

El espectro al IR fue tomado en película y presentó los siguientes máximos de absorción en cm⁻¹:

3350 (grupo OH), 1650, 1240 (C=O cetónico), 1585 (aromaticidad), 900, 845 (anillo aromático m-substituido).

2.6. Hidrólisis de FA e identificación del aglicón (AG). La hidrólisis se efectuó por reflujo de FA en una solución de HCl al 5% en metanol durante 4 horas, seguido de enfriamiento por adición de agua helada, extracción con acetato de etilo, lavados con agua hasta fin de acidez y evaporación del solvente. El producto de hidrólisis se purificó por cromatografía en columna de sílica gel 60 (0.063 a 0.2 mm de diámetro de partícula) eluyendo con acetato de etilo: acetona (80:20) y (90:10). El compuesto purificado cristalizó en etanol: agua (1:2).

Las características físicas de AG son: sólido cristalino amarillo, Pf 310, 313°C con descomposición, soluble en metanol, etanol y acetona, moderadamente soluble en acetato de etilo y cloroformo, poco soluble en agua fría y éter.

El espectro al UV presentó los siguientes máximos:

λ max en metanol 370, 301 (h), 270 (h), 255 nm
 λ max en metanol + NaOMe 425, 334, 247 (h) nm
 λ max en metanol + AlCl₃ al 5% 450, 332 (h), 304(h), 272 nm
 λ max en metanol + AlCl₃ al 5% + HCl conc. 427, 359 (h), 301 (h) 265 nm
 λ max en metanol + NaOAc 390, 320, 272, 256 (h) nm
 λ max en metanol NaOAc + H₃BO₃ 383, 330, 260 nm

El espectro al IR se tomó en película de Nujol y presentó las siguientes bandas de absorción en cm⁻¹.

3300 y 11'8 (grupo OH fenólico), 1665, 1320 (carbonilo cetónico), 1620, 1560, 1520 (aromaticidad), 800 (substitución meta de anillo aromático).

El espectro de RNM determinado a 60 Mhz en acetona deuturada presentó las siguientes señales: (ppm).

6,23, d (1H) J = 2.5 Hz corresponde al H en posición 6 de un flavonoide

6,46, d (1H) J = 2.5 Hz corresponde al H en posición 8

6,91, d (1H) J = 8.5 Hz corresponde al H en posición 5'

7,6. m (2 H) corresponde a los H en posiciones 2' y 6'.

12,6, (1H) corresponde al H del OH en 5

Se hizo también el derivado acetilado del compuesto AG mediante reflujo con la mezcla piridina: anhídrido acético (1:2) durante 6 horas, seguido de enfriamiento de la mezcla, filtración, lavado del residuo con HCl diluido y agua, y secado al vacío en un desecador. El acetato se purificó en una columna de sílica gel 60 eluyendo con cloroformo, metanol (98:2). El acetato se cristalizó en una mezcla de éter de petróleo: cloroformo (1:1).

Las propiedades físicas del derivado acetilado son: sólido blanco cristalino, Pf 190° 192°C, soluble en cloroformo, medianamente soluble en metanol, etanol, éter etílico y acetona, insoluble en agua.

El espectro al IR registrado en película sólida mostró las siguientes bandas: (cm⁻¹). 3135,

3140 (aromaticidad), 1775 (carbonilo de éster fenólico), 1625, 1501 (aromaticidad), 1475, 1370 (grupos metilo).

El espectro de RNM a 60 Mhz en acetona deuterada mostró las siguientes señales: Alrededor de 2.24 ppm varias señales que integran para 15H correspondientes a 15 hidrógenos de 5 grupos acetilo. Entre 6.93 y 7.93 ppm varias señales correspondientes a 5 H unidos a los anillos A y B de un flavonoide.

2.7. Identificación del azúcar: la fase acuosa de la hidrólisis del flavonoide se evaporó a 45°C, casi a sequedad, se le adicionó acetona, se filtró y el residuo se lavó varias veces con acetona. La identificación de este residuo se hizo por ccd en sílica gel G preparada con ácido bórico 0.03 M y usando los siguientes sistemas de solventes: buta-

Tabla No. III

HEMODINAMIA DE LOS COMPUESTOS FA Y AG

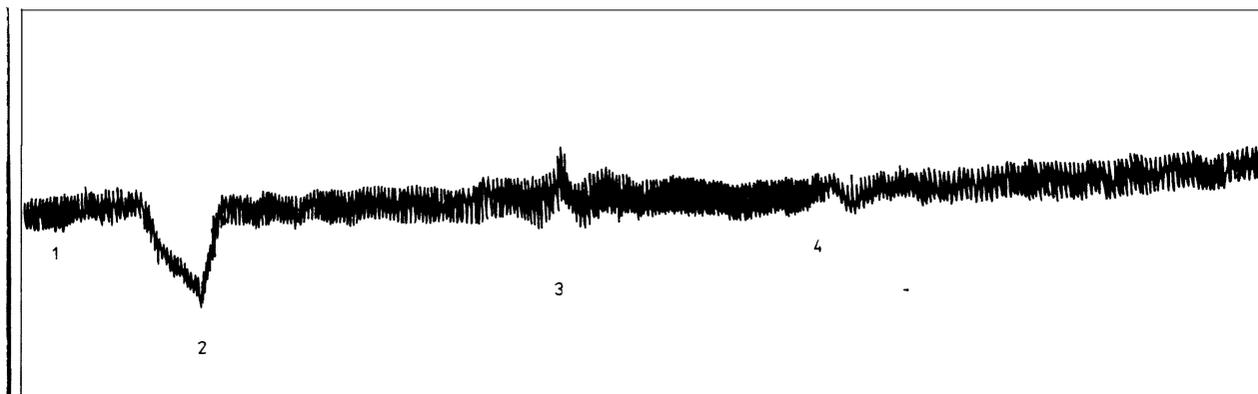
Animal de ensayo: Perro
Sexo: Hembra
Peso: 12 Kg

Material ensayado	Concentración	Cantidad inyectada		Dosis	Ref.
		Vol.	Peso		
Acetil Colina (Std.)	50 mcg/ml	19.2 Unid. Insulina	12 mcg	1 mcg/Kg	2
Adrenalina (Std.)	50 mcg/ml	19.2 Unid. Insulina	12 mcg	1 mcg/Kg	3
Compuesto FA	4 mg/ml	80 Unid. Insulina	4.0 mg	0.33 mg/Kg	5 9
Compuesto AG	4 mg/ml	80 Unid. Insulina	4.0 mg	0.33 mg/Kg	6 10

NOTA: Los resultados de esta Tabla se ilustran en los registros II a, III b

REGISTRO IIIa

ENSAYOS FARMACOLOGICOS DE LOS COMPUESTOS FA Y AG

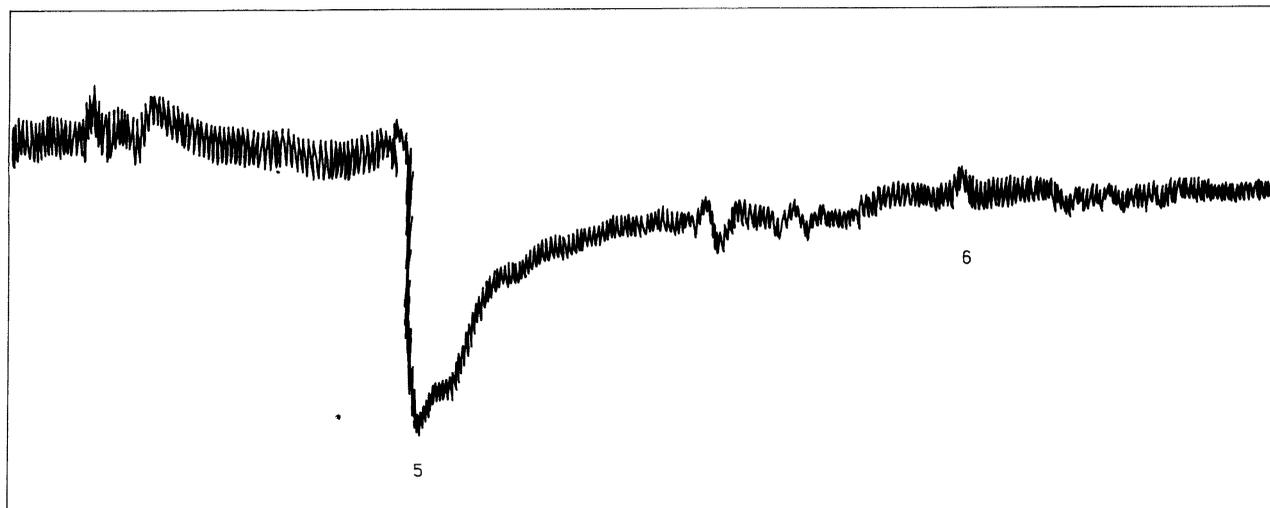


Animal: Perro
Sexo: Hembra
Peso: 12 kg

1. Registro normal
2. Acetil-colina
3. Adrenalina
4. Solvente

REGISTRO IIIb

ENSAYOS FARMACOLOGICOS DE LOS COMPUESTOS FA Y AG



5. Compuesto FA (glicósido)
6. Compuesto AG (aglicón)

nol: metanol: ácido bórico 0.03 M (70:15:10), isopropanol: agua (4:1), butanol: acetato de etilo: ácido bórico 0.03 M (50:30:10) y revelando con ácido sulfúrico al 30% en metanol seguido de calentamiento a 110°C durante 10 minutos. Junto con el azúcar a identificar se aplicaron muestras patrón de varios azúcares. El Rf de la ramnosa y el color producido después de revelar fueron iguales para el azúcar problema y el patrón de ramnosa. Se hicieron entonces ensayos específicos para la ramnosa, al azúcar problema, tales como: la prueba de Rosenthaler para metil pentosas y la del molibdato de amonio. En ambos casos se obtuvieron resultados positivos.

3. Ensayos biológicos de los compuestos FA y AG

A los compuestos FA y AG se les practicó una hemodinamia en perro de la manera descrita en la sección 2.2. Los resultados aparecen en la Tabla III y en el Registro IIIb, respectivamente. Solamente el compuesto FA mostró acción hipotensora.

DISCUSION DE RESULTADOS

El aislamiento del flavonoide con actividad hipotensora se logró con la ayuda de las pruebas biológicas efectuadas en cada paso de la purificación del extracto total. En el registro I se observa la baja de la presión arterial del perro producida por el extracto total (Et) y por el extracto obtenido por partición de Et con acetato de etilo (Eac). Los extractos en otros solventes no ocasionaron hipotensión. De las fracciones de Eac,

obtenidas por cromatografía, solamente una mostró la acción biológica (Registro II). Finalmente, la purificación, de la fracción activa, por métodos cromatográficos condujo al aislamiento del flavonoide (FA), el cual posee una acción marcada (Registro IIIb). El aglicón (AG) no presentó ningún cambio en la presión arterial del perro a dosis iguales a las usadas para el flavonoide (FA) (Registro IIIb).

La identificación de los compuestos se logró por medio de los espectros ultravioleta e infrarrojo de FA; de los cuales se sacaron las siguientes conclusiones: Posee grupo OH libre en posición 7, grupos orto dihidroxilo en posiciones del anillo B, OH substituido en posición 3 y grupo OH libre en posición 5. El espectro del RNM del aglicón (AG) confirmó estos datos y además, que las posiciones substituidas por grupos hidroxilo en el anillo eran las 3' y 4'. Los espectros al U.V. indican que, a diferencia del compuesto FA, posee un grupo OH libre en la posición 3. Esto significa que la unión glicosídica es a través del OH en 3. El espectro de RNM del derivado acetilado evidencia los protones de 5 grupos acetilo, confirmando la existencia de 5 grupos OH en el aglicón AG. Estos resultados permiten proponer la estructura siguiente: 3, 3', 4', 5,7 - pentahidroxiflavona, para el aglicón (AG) (I) y para el glicósido (FA) (II) el 3 - O - Ramnósido de Quercetina.

Las constantes físicas reportadas en la literatura (20) para la Quercitrina y la coincidieron con las determinadas experimentalmente a los compuestos FA y AG y a los patrones.

RESUMEN

De las hojas del *Croton glabellus*, una planta usada en medicina popular como hipotensora, se aisló Quercetina. Este compuesto a dosis de 0.33 mg/kg mostró actividad hipotensora en perros normotensos.

SUMMARY

Quercitrin was isolated from the leaves of *Croton glabellus*, a plant used in folk medicinal as hypotensive. Quercitrin at dose of 0.33 mg/kg exhibited hypotensive. activity in normal dogs.

BIBLIOGRAFIA

1. GARCIA, B.; Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica, Tomo II. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional, Bogotá, (1978).
2. GUAQUETA, M.; ORJUELA M.; Estudio Farmacológico del *Croton glabellus*, Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá (1976).
3. LUQUE, E.; PAREDES, L.; Caracterización de la fracción responsable del efecto hipotensor del *Croton glabellus*. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional, Bogotá, (1981).
4. RUCKSTUHL, M.; BERETZ, A.; ANTON, R.; LANDAY, V.; Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochemical Pharmacology*, **28**, 535 (1979).
5. BERETZ, A.; ANTON, R.; STOCLET, J.; Flavonoid compounds are potent inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Experientia*, **34**, 1054 (1977).
6. COCHET, C.; FIEGE, J.; PIROLLET, F.; KERAMIDAS, M.; CHAMBAZ M.; Selective inhibition of a cyclic nucleotide independent protein kinase (G type casein kinase) by quercetin and related polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, **31**, 1357 (1982).
7. FIEBRICH, F., Silymarin, an inhibitor of prostaglandin synthetase. *Experientia* **35**, 1550 (1979).
8. GOODMAN, A.; GOODMAN, L.; GILMAN, A.; Las bases farmacológicas de la terapéutica. VI Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, p. 666 (1981).
9. MIDDLETON, E., DRZEWIECKIZ, G.; KRISHNARAO, D.; Quercetin an inhibitor of antigen induced human basophyl histamine release. *The Journal of Immunology*, **127**, 546 (1981).
10. DIMAGGIO, G., CIACERI, C.; Binding of histamine in presence of quercetin. *Arch. Ital. Farmacol.*, **11**, 191 (1961). *Chem. Abstr.*, **57**, 11785i (1962).
11. UTZIG, J.; Action of some substances on the course of histamine shock. *Med. Weterynar.*, **16**, 3567 (1960). *Chem. Abstr.*, **58**, 6107h (1963).
12. RUSZNYAK, I.; STARK, M., Action of rutin and ascorbic acid on capillary resistance. Experimental search with rats. *Minerva Med.*, **52**, 2138 (1961). *Chem. Abstr.*, **58**, 14499c (1963).
13. MATUSS, S.; KRYUKOVA, L.; The role in the organism of bioflavonoids with vitamin P activity. *Biol. Khim.*, **12**, 192 (1961). *Chem. Abstr.*, **58**, 8267c (1963).
14. FERNANDEZ, M., VEGA, F.; Los Flavonoides. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, **43**, 499 (1977).
15. GROSSO, A., DE SOUSA, R.; Quercetin enhances water transport in toad bladder. *Experientia*, **37**, 742 (1981).
16. MUCSI, I.; BELADI, I.; Antiviral activity of Flavonoids. *Orvostud. Aktual. Proble.*, **31**, 51 (1978). *Chem. Abstr.* **90**, 67141y (1978).
17. PARMAR, N.; GHOSH, M.; The antiinflammatory and antigastric ulcer activity of some bioflavonoids. *Med Ed. Res.*, **1**, 6, (1976). *Chem. Abstr.* **90**, 97620w (1978).
18. DERGACHEV, I.; POTAPOVA, I.; Effect of rutin on the endocrine glands, *Vopr. Pitaniya*, **22**, 53 (1963) *Chem. Abstr.*, **57**, 11953c (1963).
19. SHARMA, R.; Effect of various isoflavones on lipid levels in Triton treated rats. *Atherosclerosis*, **33**, 371 (1979).
20. THE MERCK INDEX. Novena Edición, Published by Merck and C., Inc. Rahway, p. 7826. N.J., U.S.A. (1976).