

# Purificación parcial de un compuesto presente en las hojas de *Bauhinia megalandra* capaz de inhibir la absorción intestinal de Glucosa

Vanessa Daubront Yumar<sup>\*1</sup>, Freddy González-Mujica<sup>\*2</sup>, Norma Motta<sup>\*3</sup>, María Rodríguez<sup>\*\*4</sup> y Masahisa Hasegawa<sup>\*\*5</sup>

<sup>\*</sup>Sección de Bioquímica Médica, Instituto de Medicina Experimental Facultad de Medicina. <sup>\*\*</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela. gonzalef@cantv.net

Título corto: Absorción de glucosa y *B. megalandra*

<sup>1</sup>- Licenciado, <sup>3</sup>- Magister, <sup>2,4 y 5</sup> Doctor.

Correspondencia a: Freddy Gonzalez-Mujica, 0212 6053370, gonzalef@cantv.net.

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, Proyectos N° 0933470605 y 0933478805.

Recibido: 30/11/2007

Aceptado: 12/05/2008

## Resumen

En la actualidad muchas investigaciones se han volcado al estudio de la actividad biológica de varias plantas que se considera, en el saber de los pueblos, puedan aliviar los síntomas en pacientes con diabetes, tal es el caso de *Bauhinia megalandra*. El estudio fitoquímico de las hojas de dicha planta se realizó guiado por bioensayos, evaluando el efecto de cada fracción obtenida sobre la absorción intestinal de glucosa con la finalidad de encontrar aquella que presente el mayor efecto inhibitorio sobre dicha actividad biológica, utilizando para su medición segmentos de intestino de rata aislados *in situ*. Luego de una serie de extracciones secuenciales con diferentes solventes orgánicos y fraccionamiento por cromatografía de columna en sílica gel 60, se logró aislar y caracterizar por métodos espectroscópicos una fracción altamente enriquecida con el flavonoide apigenina glucosilada en el carbono ocho. Dicha fracción fue capaz de inhibir la absorción intestinal de glucosa en un 47,34% con respecto al control, y de generar un efecto aditivo cuando se ensayo junto a la floricina.

**Palabras Clave:** *Bauhinia megalandra*, absorción intestinal de glucosa, apigenina, floricina.

## Abstract

At present, it has been an increase in the research of the biological activity of plants used by the traditional medicine for the empirical treatment of the diabetes mellitus, such as *Bauhinia megalandra*. The phytochemical study of the leaves of these plants was done guided by bioassay, evaluating the effect of each fraction on the glucose intestinal absorption, using *in situ* rat intestinal segments. After a sequential series of extractions with organic solvents and fractionation by column chromatographic on silica gel 60, we isolated a fraction characterized by spectroscopic method to be highly enriched in the flavonoid apigenin glycosylated in the carbon eight. This fraction was able to inhibit in a 47,34% the intestinal glucose absorption compared to control, and showed an additive effect when used simultaneously with phlorizin.

**Key words:** *Bauhinia megalandra*, intestinal glucose absorption, apigenin, phlorizin.

## Introducción

La diabetes mellitus no insulino dependiente o diabetes tipo II, es una enfermedad en la cual el metabolismo de la glucosa está alterado y se caracteriza por la resistencia a la insulina o por un defecto en la secreción de la misma<sup>1</sup>.

En la actualidad muchas investigaciones se han volcado al estudio de la actividad biológica de varias plantas que se considera, en el saber de los pueblos, puedan aliviar los síntomas en pacientes con diabetes, tal es el caso de *Bauhinia megalandra*. González Mujica y col<sup>2</sup> demostraron que la

absorción intestinal de glucosa (AIG) podía ser inhibida por el extracto acuoso de *B. megalandra* de manera dependiente de la concentración. Ellos sugirieron que dicho extracto inhabilitaba al co-transportador sodio /glucosa (SGLT1), posiblemente debido a la presencia de flavonoides en esta especie, ya que se ha sugerido que dichos compuestos son efectivos como agentes hipoglicémicos<sup>3</sup>. En base a esta premisa se decidió estudiar la planta *B. megalandra* con la finalidad de aislar, caracterizar e identificar el compuesto presente en las hojas secas de dicha planta capaz de inhibir la AIG.a.

## Métodos

Se empleó ratas macho de la cepa Sprague-Dawley provenientes del bioterio del Instituto de Medicina Experimental, con un peso comprendido entre 180-220 g, con 48 horas de ayuno anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso) administrado intraperitonealmente.

Las hojas de *B. megalandra* fueron recolectadas en la Universidad Central de Venezuela en el mes de junio del año 2004, e identificadas por el Dr. S. Tillet, en el Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la U.C.V. Posteriormente, fueron desecadas a temperatura ambiente y el equivalente a 200 gr de hojas fue molido y pesado.

La AIG se midió en segmentos intestinales aislados *in situ*, de forma consecutiva y de 4 cm de longitud<sup>2</sup>. Una vez aislados a cada segmento se le inyectó, 1 ml de una solución de: para los controles, 10 mM de glucosa, 0,145 M NaCl y 2% de DMSO y a los experimentales, la misma solución anterior más la fracción en estudio. Después de 30 minutos, el líquido fue recuperado para luego cuantificar la cantidad de glucosa remanente por el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa<sup>4</sup>. Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizaron sobre Sílica Gel 60, utilizando como fase móvil mezclas de diclorometano: metanol (8:2). Las CCF se visualización con una lámpara UV a dos longitudes de onda ( $\lambda = 254$  y 366 nm); y reveladas con sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, disuelto en metanol al 50%. Las cromatografías en columna (CC) se realizaron sobre sílica gel 60 utilizando como fase móvil mezclas de metanol: diclorometano en polaridad ascendente.

## Resultados

El estudio se inició con la extracción de 200 gr de hojas molidas con acetona (1 gr/10 mL de solvente), durante 36 horas, a temperatura ambiente y agitación constante. El extracto de acetona fue secada utilizando un evaporador rotatorio (EA; 13,1 g). Luego de seco, el material vegetal remanente fue extraído con etanol (EE; 11,5 g) como antes. El EE mostró un mayor efecto inhibitorio (43%) que el EA sobre la AIG.

El EE fue lavado con acetona al 100% y la parte soluble fue desecada bajo las mismas condiciones ya antes mencionadas (F1S: 5,0 g); mientras la fracción insoluble fue resuspendida en metanol y luego secada (F1IN; 2,3 g). F1S presentó un mayor efecto inhibitorio (49%) sobre la AIG que F1IN.

F1S fue lavado con una mezcla metanol:agua (1:1) y la fracción soluble (F2S; 4,4 g) e insoluble (F2IN; 0,43 g) secadas. De ambas fracciones F2S fue la que presentó el mayor efecto inhibitorio sobre la AIG (37%). Por análisis en CCF se encontró que F2S esta constituida por clorofilas, flavonoides e iridoides o monoterpenos; por lo que se decidió separar por CC en sílica gel 60. De este procedimiento se obtuvo un total de 16 fracciones colectivas, de las cuales F26 fue la que presentó la mayor actividad inhibitoria (37%) sobre la AIG. Mediante CCF de F26 se determinó que esta fracción esta constituida por clorofilas, terpenos y flavonoides. En base a los resultados de CCF, se procedió a continuar con la

separación de F26, mediante una CC con lo cual se obtuvo un total de 11 fracciones colectivas, de las cuales F4 fue la más efectiva con un porcentaje de inhibición de 47,34% sobre AIG.

Al realizar CCF se encontró que la F4, esta constituida por terpenos y flavonoides, siendo estos últimos los compuestos mayoritarios. En el espectro de RMN-1H de F4 (Fig. 1) se apreció un doblete (1H, d, J= 2.2 Hz) característico del protón H-6 (6.20 ppm) y otro doblete (1H, J= 2.0Hz) del protón H-8 (6.38 ppm) con acoplamiento *meta* en el anillo A. Para el anillo B se pudo observar un doblete a los 6.94 ppm (1H, d, J=9.0 Hz) acoplado en orto con el proton H-2' que se observó a los 7.77 ppm (1H, d, J= 8.8 Hz) junto con su protón equivalente H-6', que a su vez está acoplado en *orto* con el protón H-5', cuya señal tuvo un desplazamiento en 6.94 ppm (1H, d, J=9 Hz). Además, en 7.01 ppm se pudo apreciar un singlete correspondiente al protón H-3 del anillo C. En el espectro de RMN-13C de f4 (Fig.2), se pudo observar las señales de las posiciones 5 y 7 del anillo A, que probablemente se encuentren sustituidas por grupos hidróxilo (~160 y 164 ppm, respectivamente); la de los carbonos C-6 y C-8 (98.5 y 93.4 ppm, respectivamente) y la del C-3, el cual se presenta a 102.18 ppm. Con respecto a los carbonos del azúcar se aprecian señales reportados por los C-glucósidos unidos al carbono 8, entre las cuales destacan las señales de los carbonos C-2", C-4" y C-6" (71.83, 61.45 y 70.77 ppm, respectivamente).

Como se observa en la Fig. 4, F4 y floricina (un conocido inhibidor del SGLT1) mostraron un efecto inhibitorio aditivo sobre la AIG.

## Discusión

Basados en los resultados de la resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H (Fig. 1) y de <sup>13</sup>C (Fig. 2), se pudo establecer que la fracción F4 se encuentra constituida de forma mayoritaria un compuesto con el esqueleto de una flavona, identificada como apigenina, la cual está sustituida en las posiciones 5, 7 y 4' con grupos hidroxilo y glicosilada en el carbono 8 por una hexosa (Fig. 3) y que dicha fracción es capaz de inhibir la AIG en un 47% con respecto al control.

La inhibición aditiva ejercidas por las moléculas presentes en F4 y por la floricina (Fig. 4), sugieren que ambos ejercen su acción sobre el mismo blanco, el transportador sodio-glucosa (SGLT1) presente en la membrana apical del enterocito. Estos resultados están de acuerdo con lo publicado por Gonzalez-Mujica y col.<sup>2</sup>.

De los resultados anteriores podemos concluir que la apigenina glicosilada por una hexosa en el carbono 8 es la molécula, o una de las moléculas, presente en el extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* responsable de la inhibición de la AIG.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, Proyectos N° 0933470605 y 0933478805.

Fig. 1 Resonancia Magnética nuclear de <sup>1</sup>H de la Fracción F4

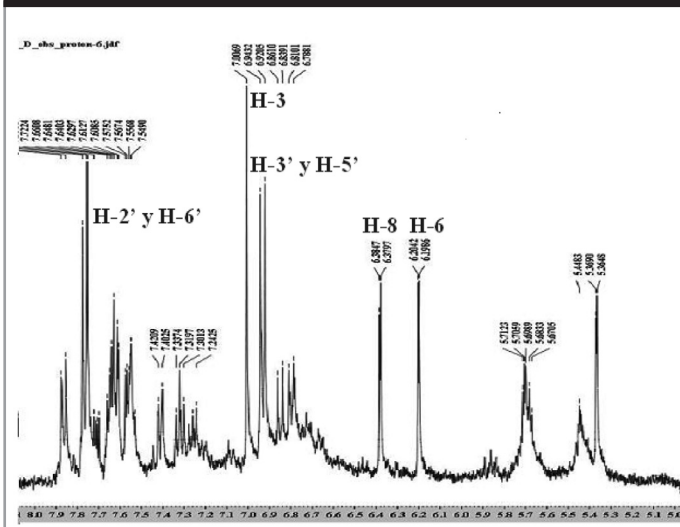


Fig. 2 Resonancia Magnética nuclear de <sup>13</sup>C de la fracción F4

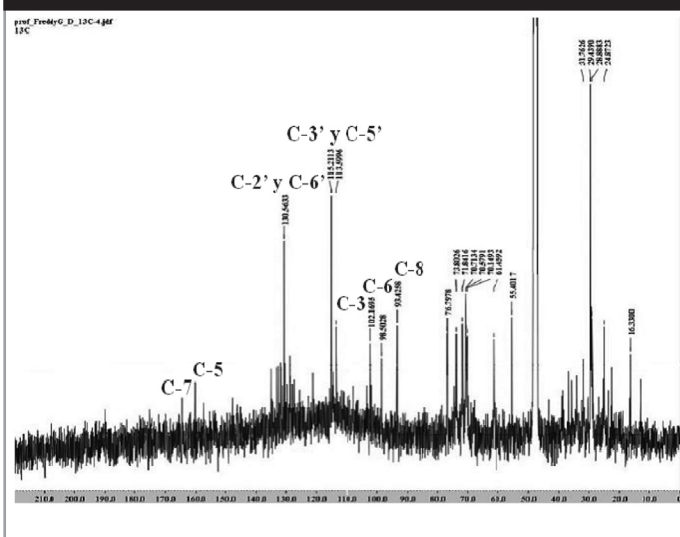


Fig. 3 Apigenina 8-glucósido

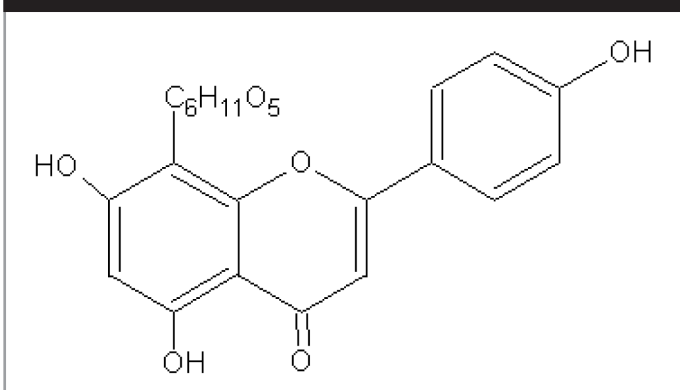
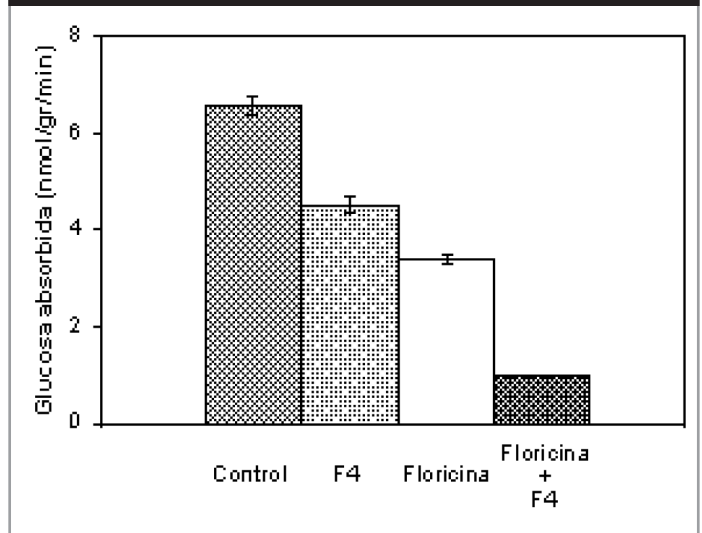


Fig. 4 Efectos de la fracción F4 y la floricina sobre la absorción intestinal de glucosa



En segmentos intestinales de rata, aislados in situ se inyectó 10 mmol glucosa y 0,14 M NaCl en ausencia (control) o presencia de 1mg/mL de F4, ó 0,1 mM floricina o la combinación de ambos. A los 30 min., en el líquido remanente se determinó la glucosa. Los valores corresponden al promedio de 3 experimentos ± el error estándar. En cada experimento se utilizó 3 animales.

## Referencias

1. Dean, L & Mc Entyre, J.R. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>) 2004.
2. Gonzalez-Mujica, F., Motta, N., Márquez, A.H. and Capote-Zulueta, J. Effects of Bauhinia megalandra aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. *Fitoterapia*. 2003; 74: 84-90.
3. El-Wahab, A., Wassel, G.M., Armar, N. and Hanna, T. Flavonoid constituents in the different organs of selected *Bauhinia* species and effect on blood glucose. *Herba Hung*. 1987; 26: 27-39.
4. Trinder, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. *J Clinic Pathol*. 1969; 22:246.
5. Panayatova-Heiermann, M., Loo, D.D.F. and Wright, E.M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. *J Biol Chem*. 1995; 270: 27099-27105.