

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACION DE FLAVANONAS Y ALCALOIDES DE NATURALEZA INDOLICA EN HOJAS DE *Perezia multiflora* (H. et B.) Less. "escorsonera".

Luis Félix V., Pablo Bonilla R., Américo Castro L, Fritz Choquesillo P., Hugo Milla F.

Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. Sección de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM

RESUMEN

En la presente investigación, se ha realizado un estudio fitoquímico para determinar la presencia de metabolitos secundarios en *Perezia multiflora* (H et B) Lees "Escorsonera".

Se realizó un estudio botánico de esta especie indicando su ubicación sistemática y descripción morfológica. Asimismo, se presenta una revisión química y actividad farmacológica de los componentes que se encuentran en mayor proporción, como son los flavonoides y alcaloides.

Se realizó cromatografía en capa fina, cromatografía en escala preparativa, logrando separar dos flavonoides. Por espectroscopía UV se logró identificar al flavonoide de tipo flavanona que correspondería a la: 7 - O -RAMNOGLUCOSIL - 3' , 5 - DIHIDROXI - 4' -METOXIFLAVANONA y el otro probablemente sería: 3',5,7 -TRIHIDROXI - 4' - METOXIFLAVANONA, también se identifican los alcaloides cuyas estructuras probablemente serían: 1, 4 - (1,3-PIPERIDIL-DIENO)-2,5 - OXO - 6 - HIDROXI - 2H, 3H - INDOL -ETENO y el 1,4-(1,3-PIPERIDIL-DIENO) -2, 5- OXO-6-O-GLUCOSIL-2H,3H-INDOL -ETENO.

Palabras claves: Escorsonera, Cirantin, Hesperidina, Flavanona, Indol.

ABSTRACT

In the present investigation a phitochemical study of Prezia multiflora (H et B) lees Escorsonera was accomplished in order to determine the presence of secondary metabolites.

A botanic study of this specie has been made to indicate its systematic location and morfological description.

A chemical and pharmacological review of the mayor components, as flavonoids and alcaloids; has also been performed.

TLC and preparative chromatography were done, ending with the separation of two flavonoids.

The identification of the flavonoid (flavonone type) as 7-O-RHAMNOGLUCOSIDE-3',5-DIHYDROXY-4'METOXYFLAVANONE, was done by UV spectroscopy. The other one probably would be: 3',5,7-TRIDIHYDROXY-4'-METOXYFLAVANONE. Two alcaloids were also identified and their probable structure would be: 1,4-(1,3-PIPERIDIL-DIENO)-2,5-OXO-6-HYDROXY-2H,3H-INDOL-ETENO and 1,4-(1,3-PIPERIDIL-DIENO)-2,5-OXO-6-O-GLUCOSYL-2H,3H-INDOL-ETENO.

Key words: Escorsonera, Cirantin, Hesperidin, Flavanone, Indol.

INTRODUCCIÓN

La medicina folklórica o popular desempeña un papel muy importante en nuestro país y es por esto que es primordial el conocimiento químico de los metabolitos secundarios que dan las propiedades farmacológicas benéficas, con la finalidad de darles uso racional.

El género *Perezia* es uno de los miembros de la tribu Mutisieae. En la actualidad se conocen aproximadamente 85 especies, todas americanas con dos áreas de distribución; una en Norteamérica (México, Arizona, Massachusetts, etc.) y otra en Sudamérica a uno y otro lado de los Andes, especialmente de Perú, Bolivia, Chile y Argentina. En el Perú se conocen actualmente 15 especies. (1).

Perezia multiflora constituye una planta de la puna, puede crecer también entremezclada con el pajonal o estepa de gramíneas. Esta especie está ampliamente difundida en los Andes del Perú y Bolivia, entre los 3600 y 4400 m. de altitud. (2).

El presente Trabajo de Investigación de *Perezia multiflora* (H. et B.) Less "Escorsonera" surge por la información popular de las comunidades campesinas que la emplean como expectorante, en el tratamiento del resfrío común y sus secuelas y como antiinflamatorio. El objetivo ha sido investigar fitoquímicamente a la especie *Perezia multiflora*, con la finalidad de determinar la composición de sus componentes químicos y elucidar la estructura química mediante reacciones químicas, análisis cromatográfico y espectroscópico de las flavanonas y alcaloides de naturaleza indólica, asimismo; se determinó la actividad farmacológica del extracto seco.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección y preparación de la muestra:

La muestra fue recolectada en las alturas de la ciudad de Cerro de Pasco, distrito de Chaupimarca, a 4380 m. sobre el nivel del mar, en el mes de junio de 1995. De la muestra colectada se realizó la separación de hojas, tallos y frutos, se secó y estabilizó en una estufa de aire circulante a 40 ° C. Una vez seca la planta, se utilizaron las hojas para la investigación, las cuales fueron molidas a polvo y conservado en un frasco ámbar.

Estudio Fitoquímico:

1.- Extracción del metabolito secundario:

Se pesaron 40 g. de polvo de hojas secas, se maceró con alcohol etílico 80° durante siete días, luego se filtró y el líquido se evaporó obteniéndose el extracto el cual fue utilizado para el análisis.

2.- Solubilidad:

Se hicieron ensayos de solubilidad con solventes de acuerdo al orden creciente de polaridad.

3.- Reacciones de color:

Para reconocimiento de fenoles con tricloruro de hierro; flavonoides con el reactivo de Shinoda; aminoácidos con ninhidrina; alcaloides, con Dragendorff y Mayer; esteroides con la reacción de Lieberman-Bouchard; taninos con solución de gelatina.

4.- Identificación:

Se disolvió el extracto seco en metanol, se hicieron varios ensayos para determinar el sistema de solvente adecuado, siendo benceno-cloroformo (1:1 v/v) el más indicado, al desarrollar el cromatograma y revelar con el reactivo de Dragendorff se determinó la presencia de dos posibles alcaloides, luego al revelar con ácido sulfúrico y tricloruro de

hierro se observa la presencia de once compuestos fenólicos.

5.- Aislamiento y purificación:

Después de identificar la presencia de dos posibles alcaloides y once posibles compuestos fenólicos, se realizó una cromatografía en escala preparativa de 5 x 20 utilizando el sistema de solvente BAW (3:1:1 v/v), para el revelado se dividió en tres partes iguales a la primera se añadió el reactivo de Dragendorff confirmándose la presencia de dos manchas, a la segunda porción se reveló con luz UV y amoníaco, mostrando nítidamente la presencia de dos manchas fluorescentes, y la tercera porción se reveló con ácido sulfúrico presentando dos manchas nítidas a la misma altura de las que se observó al revelar con luz UV. (3).

Después de separados de la placa cromatográfica se purificó, disolviéndolos en metanol, luego filtrando y evaporando la solución, se obtuvieron unos cristales denominándolos F1 y F2.

El aislamiento de los alcaloides se hizo a partir de 3,8 g de hojas secas con HCl 0,1N en baño maría, se alcalinizó y se extrajo con cloroformo, se concentró y se verificó la presencia de alcaloides con los reactivos de Dragendorff y Mayer. (4).

Se realizó una cromatografía en escala preparativa utilizando el sistema de solvente metanol-hidróxido de amonio (200:3 v/v), se aislaron los dos posibles alcaloides mediante el raspado de la sílica con la muestra, se purificó disolviéndolos en metanol, filtrando y evaporando la solución, se obtuvieron unos cristales denominándolos PMA y PMB.

Elucidación estructural por espectroscopía
Los cristales F1 y F2 fueron disueltos en metanol para el análisis espectroscópico UV en

el espectrofotómetro de DIODO REVERSO HP 8452^a.

Los cristales PMA y PMB fueron disueltos en acetona para el análisis IR en un espectrofotómetro IR (FT-IR) MODELO IMPAC 410, luego se disolvieron en metanol para el análisis espectrofotométrico UV en un ESPECTRONIC GENESYS 5.

Actividad Farmacológica

Actividad antiinflamatoria

Método del edema pedal inducido por carragenina: Se utilizaron ratas machos, con peso entre 170 a 220 g en ayunas de 12 horas, el edema fue inducido por la inyección subplantar de 0,2 ml de una suspensión de carragenina al 1% en la pata trasera derecha del animal; el extracto fue administrado por medio de una sonda de administración por vía oral media hora antes de la inyección de carragenina. El volumen de las patas fue medido cada hora hasta 5 horas después de la inducción de la inflamación utilizando un pletismómetro manual, diseñado en la Cátedra de Farmacología de esta Facultad.

RESULTADOS

Al realizar el análisis fitoquímico del extracto de *Perezia multiflora* (H. et B.) Lees "Escorsonera" se encontró:

En el cuadro 1 observamos que el extracto es soluble en casi todos los solventes.

Los resultados de la marcha fitoquímica, se muestran en el cuadro 2.

En la identificación de los metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina el extracto seco se disolvió en etanol, en un primer cromatograma con el sistema de solvente butanol- ácido acético - agua (3:1:1 v/v) y al

revelar con el reactivo de Dragendorff se observó la presencia de dos manchas de color naranja lo que nos indica que hay dos alcaloides (Fig 1), al revelar con luz UV 366 nm se observaron por lo menos 11 manchas con diferentes fluorescencias; al agregar ácido sulfúrico se observó las 11 manchas con diferentes Rf, intensificadas, observándose que dos de ellas las de mayor cantidad resaltan con una intensidad mayor que las demás que es un comportamiento característico de los flavonoides.

Se aisló y se purificó los flavonoides mediante cromatografía en escala preparativa con el sistema de solvente butanol- ácido acético - agua (3:1:1 v/v) las manchas denominadas F1 y F2, fueron las que se aislaron por presentar el color fluorescente característico de flavonoides al ser revelados con UV/ NH₃ y un color verdoso cuando se reveló con ácido sulfúrico, se purificó con el mismo sistema de solvente, filtrando y evaporando la solución obteniéndose unos cristales.

Para el aislamiento de los alcaloides presentes en el extracto se preparo el sistema de solventes metanol-hidróxido de amonio (200:3 v/v), a las manchas se les denominó PMA y PMB, estos productos dieron el color característico al ser revelado con Dragendorf, se purifico en metanol, obteniéndose unos cristales.

En las figuras 1 y 2 nos indica los valores espectroscópico de F1 y F2, que presentan características de flavanonas y la elucidación de su estructura.

En el cuadro 3 nos dan los valores espectroscópicos UV de PMA Y PMB, determinándose que son alcaloides de naturaleza indólica.

En los cuadros 4, 5 y 6 se indica la elucidación estructural de las fracciones PMA y PMB, con sus respectivos valores espectroscópicos IR, determinándose que son alcaloides de naturaleza indólica.

Los resultados sobre el efecto antiinflamatorio del extracto de *Perezia multiflora*, ha evidenciado tener una actividad ligera a un nivel de significancia de 5%, como se muestra en los cuadros 3 y 4.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se confirma la presencia de dos flavanonas y dos alcaloides, los cuales fueron denominados F1, F2 y PMA, PMB.

Al estudiar el extracto hidroalcohólico de *Perezia multiflora*, se utilizaron una serie de solventes para lograr una mejor separación de las fracciones, así se usó: benceno - cloroformo (1:1 v/v) para identificar los alcaloides y compuestos fenólicos; butanol-ácido acético - agua (3:1:1 v/v) para el aislamiento de las flavanonas y metanol - hidróxido de amonio 200:3 v/v para el aislamiento de alcaloides de naturaleza indólica.

En la elucidación estructural mediante espectroscopía UV-visible de las fracciones F1 y F2 se encontró:

La fracción F2 (Fig. 2)

UV (MeOH): 282, 326 nm

Al analizar el espectro UV de esta fracción y comparando con lo publicado por Mabry, Markham y Thomas, la estructura

de este compuesto es semejante a la 7-O-ranoglucosil-3',5-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (147) que presenta un λ máximo de 283, 326 nm.(5). Se realizó una prueba adicional para determinar la presencia de grupo funcional hidroxilo con tricloruro de hierro resultando positiva la reacción.

La Fracción F1 (Fig. 1)

UV. (MeOH): 272, 326 nm

Es un compuesto que tiene espectros similares al de la Fracción F2 y también presenta las mismas reacciones químicas, por lo que se indica que la estructura del compuesto son muy similares, es el aglucón de la 7-O-ranoglucosil-3',5 - dihidroxi - 4' - metoxiflavanona, 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona (6).

En las Fracciones PMA Y PMB (cuadro 3)

En la elucidación estructural mediante el análisis espectroscópicos UV decimos que los compuestos aislados de las fracciones PMA y PMB, muestran la presencia de picos que corresponden a dos bandas: 226 - 280 nm y 225 - 280 nm, bandas que corresponden a los alcaloides de naturaleza indólica que absorben a 226 y 280-295 nm (7, 8).

En la elucidación estructural mediante espectroscopía UV-visible e IR de las fracciones PMA y PMB se encontró:

En las Fracciones PMA y PMB (cuadro 4)

Para completar la elucidación estructural se realizó el análisis espectroscópico IR, en donde el pico 3437,56 cm indica la presencia de grupos hidroxilo, este pico está un poco

deformado y ancho. Los picos 2921,87 y 2847,31 indican la presencia de C-H. El pico 1679,27 que indica la presencia de cetona (no saturada y finalmente los picos 1231,93 y 1362,40 son producidos por la deformación de amina secundaria (9).

En consecuencia se sugiere que el compuesto aislado PMA tendría la siguiente estructura: 1, 4 (1,3-PIPERIDIL-DIENO) -2,5-OXO-6-HIDROXI- 2H, 3H - INDOL -ETENO y su tautómero.

La Fracción PMB aislada tendría la siguiente estructura: 1,4 (1,3-PIPERIDIL-DIENO)-2,5-OXO- 6-O-GLUCOSIL-2H, 3H-INDOL-ETENO y su tautómero.

En los Cuadros 7 y 8

La administración oral del extracto (750 mg/kg) produjo una disminución del proceso inflamatorio inducido por carragenina alrededor del 24,32%, esto se observó a las 2 horas de administrado el extracto, dicho efecto es menor al del estándar utilizado (Indometacina), que fue 56,09%; esto se debe a la presencia de la 7-O-ranoglucosil-3',5-dihidroxi-4' metoxiflavanona como lo reportan Emin, Oliveira, Lapa (1994), (10) quienes manifiestan que la 7-O-ranoglucosil-3',5-dihidroxi-4' metoxiflavanona reduce el edema de la pata inducida por carragenina, en un 47 a 63%, siendo este efecto similar al producido por la Indometacina

Cuadro 1: Solubilidad del extracto seco

Solvente	Característica	
	0,5ml.	1ml.
Agua	Insoluble	Insoluble
Etanol	Insoluble	Soluble
Metanol	Soluble	Soluble
Acetona	+ soluble	Soluble
Cloroformo	+ soluble	Soluble
Acetato de etilo	Soluble	Soluble
Benceno	Soluble	Soluble

Cuadro 2: Marcha fitoquímica de *Perezia multiflora*

Metabolitos secundarios	Reacción	Resultado	Extracto metanol
Taninos	Solución gelatina 1%	Precipitado	+
Aminoácidos	R. de Ninhidrina	No hay coloración	-
Flavonoides	R. Shinoda	Color rojo	+
Esteroides	R. Lieberman	Precipitado	+
Alcaloides	R. Dragendorff	Precipitado	+
Compuestos fenólicos	Sol. Tricloruro de Hierro	Color verde	+

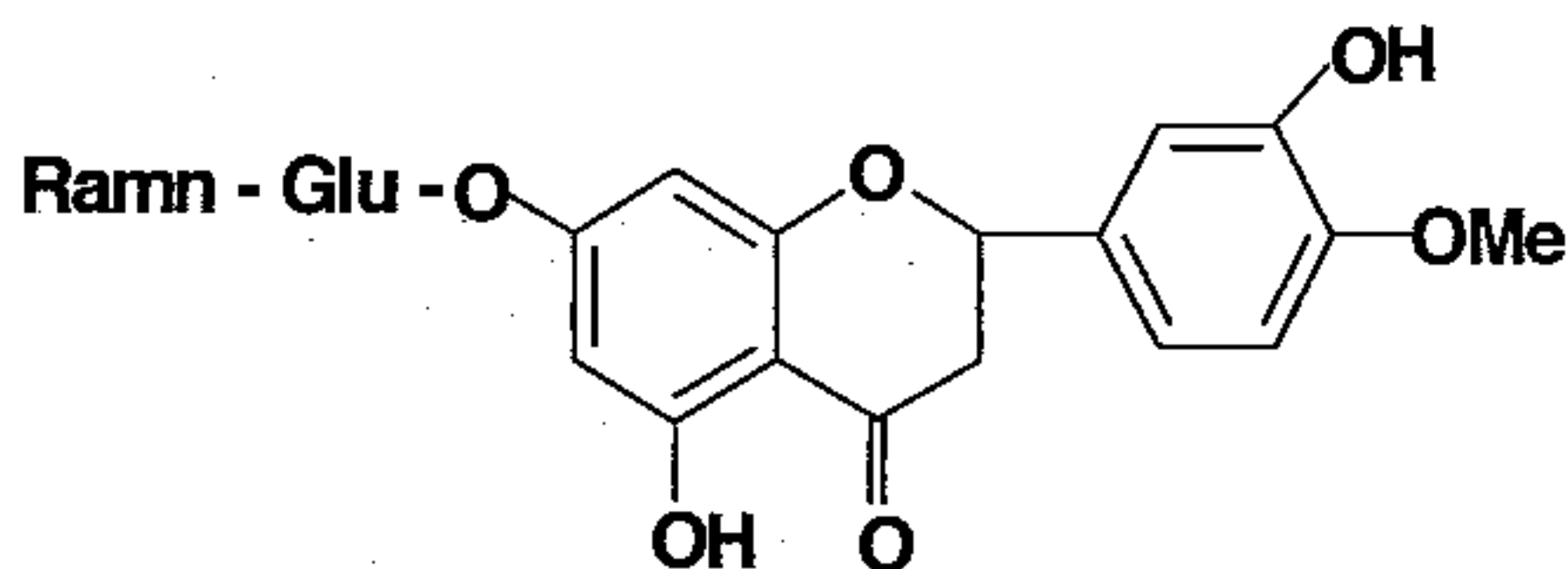
LEYENDA: (+) Presencia de metabolito

(-) Ausencia de metabolito

FIGURA 01

ESPECTROSCOPIA UV DE F1

Color de la mancha: Luz UV : Púrpura
Luz UV/NH₃ : Amarillo verdoso



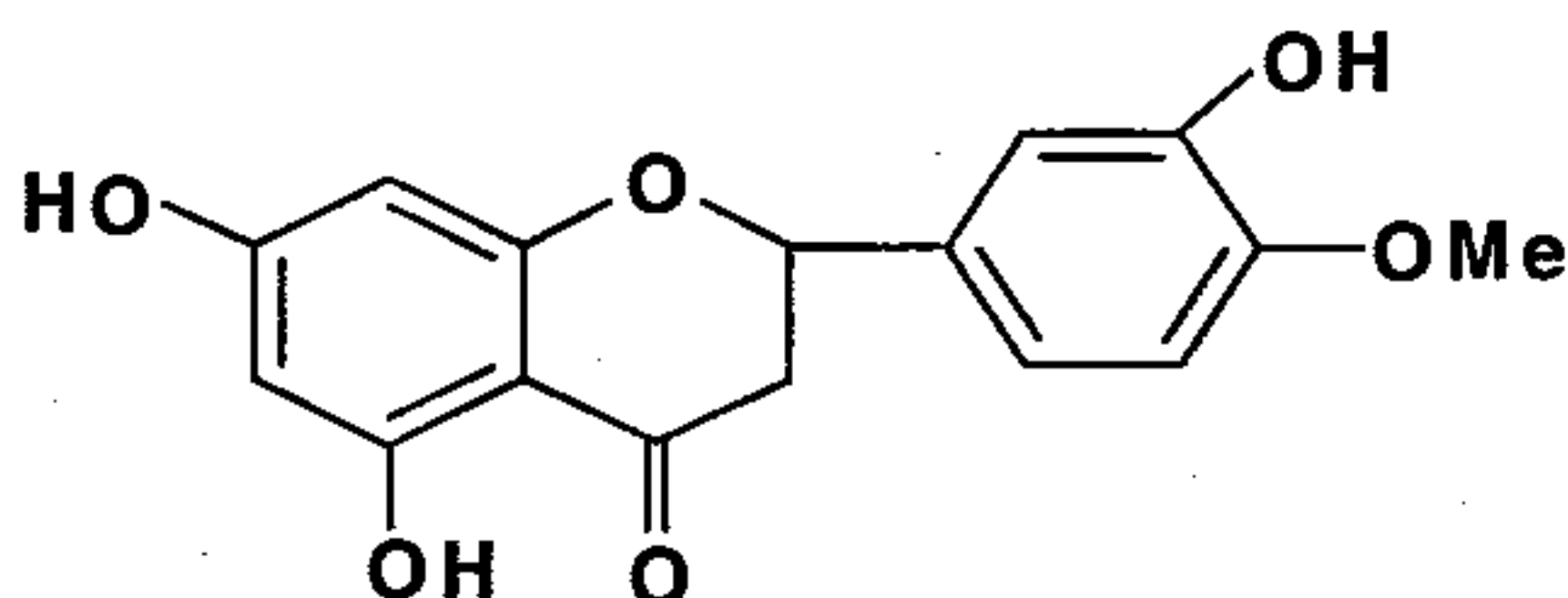
3', 5, 7 – TRIHIDROXI - 4' - METOXIFLAVANONA

FIGURA 02

ESPECTROSCOPIA UV DE F2

Color de la mancha: Luz UV : púrpura fluorescente

Luz UV/NH₃ : Amarillo verdoso



7-O-RAMNOGLUCOSIL-3',5-DIHIDROXI-4'METOXIFLAVANONA



Cuadro 3. Espectroscopia UV de PMA, PMB

Espectro Ultravioleta	
Muestra	Absorbencia
PMA	226, 280 nm
PMB	225 – 280 nm

Cuadro 4. Espectroscopía IR de PMA y PMB

Espectro Infrarrojo Lectura DE 500-4000 cm ⁻¹	
U	Grupo Funcional
3437,76 cm ⁻¹	Hidroxilo (OH)
2847,31 – 2921,87	Enlace C-H Alifatico
1697,91 – 1679,27	Cetona αβ No Saturado
1231,93 – 1362,40	Deformación de Amina Secundaria

Cuadro 5. Ampliación de la región 700 – 1800 cm^{-1}

Espectro Infrarrojo Lectura de 700–1800 cm^{-1}		
U	Grupo Funcional	
PMA	PMB	
1451,82	1462,47 cm^{-1}	C – H
1421,65 cm^{-1}	1421,65	Doble Enlace
1368,39 cm^{-1}	1362,40 cm^{-1}	C = C
1235,26 cm^{-1}	1231,93 cm^{-1}	Enlace
1096,80	1125,20 cm^{-1}	Carbono
1015,14 cm^{-1}	1095,02 cm^{-1}	Oxígeno (C=O)

Cuadro 6. Ampliación de la region 2400 – 3400 cm^{-1}

Espectro Infrarrojo Lectura DE 2400- 3400 cm^{-1}		
U		Grupo Funcional
PMA	PMB	
2978,56 cm^{-1}	2960,90 cm^{-1}	Enlace Carbonohidrogeno (C – H)
2920,30 cm^{-1}	2921,87 cm^{-1}	
2854,98 cm^{-1}	2847,31 cm^{-1}	

Cuadro 7. Actividad antiinflamatoria del extracto seco de *Perezia multiflora*

	Volumen del edema (mL)				
	1h	2h	3h	4h	5h
Control	1,19	1,48	1,60	1,66	1,53
Extracto	0,92	1,12	1,29	1,39	1,29
Indometacina	0,60	0,65	0,70	0,60	0,50

Cuadro 8. Eficiencia antiinflamatoria del extracto seco de *Perezia multiflora*

	1h	2h	3h	4h	5h
Extracto	22,69	24,32	19,38	16,27	15,69
Indometacina	49,58	56,09	56,25	63,86	67,32

CONCLUSIONES

Mediante la marcha fitoquímica se detectó la presencia de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, taninos.

Se logró aislar y elucidar estructuralmente el 7-O-ranoglucosil-3',5-dihidroxi-4'-metoxiflavanona y el: 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona y alcaloides de naturaleza indólica que sería: 1,4-(1,3-PIPERIDIL-DIENO-2,5-OXO-6-HIDROXI-2H, 3H-INDOL-ETENO y el 1,4-(1,3-PIPERIDIL-DIENO-2, 5-OXO- 6-O-GLUCOSIL-2H, 3H-INDOL-ETENO y sus tautómeros.

Los flavonoides presentes en la planta de tipo flavanona serían los responsables de la actividad antiinflamatoria encontrada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Tovar, S.O. 1955.** Publicaciones del Museo de Historia Natural "Javier Prado" U.N.M.S.M. Serie B Botánica N° 8.
2. **Valdizan, H., Maldonado, A. 1922.** La Medicina Popular Peruana. Imp. Torres Aguirre. CISA. (1985).
3. **Harborne, J.B. 1975** Review, Flavonoid sulphates. A new class of sulfur compounds in higher plants. *Phytochem*, 14, 1147 - 1155.
4. **Lawson, D.R., Erb, W.A., Miller A.R. 1992.** Analysis of Solanum alkaloids using internal standarization and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 40 N° 11 Pág. 2186-2191.
5. **Mabry, T.I., Markham, K.R., Thomas, M.B. 1970.** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlog. New York. Heidelberg-Berlin. Pág. 259-260.
6. **Index Merck. 1989.** Eleventh E.C.E.
7. **Lock, O. 1994.** Investigación Fitoquímica. Métodos de estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Pág. 114.
8. **Dominguez, X.A. 1973.** Métodos de investigación fitoquímica. Limusa Wiley. México. Pág 81-90.9.
9. **Silverstein, R., Bassler, C., Morrill, T. 1980-1991.** Identificación espectrofotométrica de compuestos orgánicos. Editorial Diana. México. Pág. 85-170.
10. **Emin, J.A., Oliveira, A.B., Lapa, A.J. 1994.** Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoids, hesperidin and the isoflavonoids, duartin and clause quinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2) 118-22.

