

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**



**IDENTIFICACION DEL COMPUESTO PRESENTE EN EL EXTRACTO DE
BAUHINIA MEGALANDRA, RESPONSABLE DE LA INHIBICION DE LA
ABSORCION INTESTINAL DE GLUCOSA**

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela
por la **Br. Patricia Rodríguez Muñoz**
como requisito parcial para optar al título de
LICENCIADA EN BIOLOGIA.

Tutor: Dr. Freddy Gonzalez Mujica.

Caracas, Septiembre 2009.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

- **A Dios.**
- **A mi padre,** por todo su apoyo y por ser un ejemplo de perseverancia.
- **A mi madre,** por todo su amor, apoyo y comprensión.
- **A mi hermanos Angela, Diana y Gary,** por todo su cariño, que siempre están conmigo y me alegran todos los días.
- **A gran mi Familia,** por estar de alguna manera siempre presente.
- **A mi tutor Freddy Gonzalez Mujica,** por permitirme trabajar con él, aprender de de todos sus conocimientos y por la inmensa ayuda brindada.
- **A mis amigas, Anayanci, Lisbeth, Monica, Maria Andreina, Samanta y Gabriela,** por hacer de mi vida universitaria una experiencia inolvidable.
- **A Luis (miida),** por todo su cariño, paciencia, apoyo y ayuda brindada. Gracias gordito!
- **A mis compañeras del Laboratorio de Bioquímica Médica, Loimar y Sandra,** por todos los momentos gratos compartidos en el laboratorio.
- **A Jairo,** por toda la ayuda brindada en la realización de los métodos cromatograficos y realización de los espectros de mi tesis. Mil Gracias Jairo!
- **Al profesor Hasegawa,** por permitirme trabajar en el laboratorio de Productos Naturales y toda la colaboración brindada.

Y a todas aquellas personas que me acompañaron y ayudaron en mi carrera universitaria y en la realización de esta Tesis de Grado

A todos Muchas Gracias.

RESUMEN

Uno de los principales factores que incrementan la glicemia se encuentra la absorción intestinal de glucosa, por lo cual el reducir la misma, pudiera ser un factor importante para disminuir la hiperglicemia en pacientes diabéticos.

Paralelamente se demostró que el extracto metanólico de las hojas de *B. megalandra* inhibía la absorción intestinal de glucosa, por lo cual en el presente trabajo se planteó la identificación del compuesto presente en el extracto de *B. megalandra* responsable de la inhibición de la absorción intestinal de glucosa.

Se fraccionó el extracto metanólico de las hojas de *B. megalandra* guiado por bioensayos, empleando un fraccionamiento con diferentes solventes y por cromatografía en contracorriente. Por el uso de dicha metodología se obtuvo dos compuestos puros los cuales fueron identificados por RMN-[¹H] y RMN-[¹³C] como kanferol 3-*O*- α -ramnosido y quercetina 3-*O*- α -ramnosido. El primero de los cuales varió significativamente el valor de K_M de 38,93 mM, para el control, a 67,24 mM y sin un cambio significativo para el valor de V_{MAX} . Además se demostró que el kanferol 3-*O*- α -ramnosido ejerció un efecto sinérgico al combinarlo con floricina, por lo cual sugerimos que el kanferol 3-*O*- α -ramnosido tiene como blanco al cotransportador SGLT1.

INDICE

Contenido	Página
1. Introducción	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.2. Absorción intestinal	2
1.3. Glicemia	5
1.4. <i>Bauhinia megalandra</i>	7
1.4.1 Antecedentes del genero <i>Bauhinia</i>	8
1.5. Flavonoides	9
1.5.1 Tipos	10
1.5.2 Antecedentes de Flavonoides	13
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo General	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Materiales y Métodos	16
3.1. Materiales	16
3.1.1. Animales	16
3.1.2. Material vegetal	16
3.1.3. Material químico	16
3.1.4. Equipos	16
3.2. Métodos	18
3.2.1. Preparación del extracto vegetal	18
3.2.2. Métodos cromatográficos	20

3.2.2.1	Cromatografía de Capa Fina	20
3.2.2.2	Sistema de Contracorriente	20
3.2.3	Métodos espectroscópicos	21
3.2.4	Absorción intestinal de glucosa	21
3.2.5	Determinación del punto de saturación de la absorción intestinal de glucosa	23
3.2.6	Efecto de la adición de floricina	23
3.2.7	Método enzimático GOD/POD	23
3.2.7.1	Fundamento	23
3.2.7.2	Ensayo	24
4	Resultados	25
5	Discusión	33
6	Conclusiones	39
7	Recomendaciones	40
8	Referencias	41
9	Anexos	45

1. INTRODUCCION

Según el boletín publicado en el 2006 por el Ministerio de Salud y Desarrollo, en Venezuela existe una alta incidencia de personas que padecen diabetes, encontrándose esta enfermedad en el sexto lugar entre las principales causas de muerte, la diabetes es una enfermedad degenerativa y a menudo fatal si no se sigue un tratamiento adecuado, debido a que pueden surgir complicaciones como atacar órganos principales.

1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad en la cual el metabolismo de la glucosa está alterado, tal que, la energía necesaria para el correcto funcionamiento del organismo no puede ser derivada a partir de la glucosa proveniente de la dieta. Dicha enfermedad, comprende un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizados por un alto nivel de glucosa en la sangre (Sperelakis, 2001). Cuatro tipos principales de diabetes han sido definidas por la National Diabetes Data Group (NDDG) (National Diabetes Data Group, 1979) y la Organización Mundial de la Salud (OMS): diabetes mellitus insulino dependientes (IDDM, por sus siglas en inglés), diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM, por sus siglas en inglés), diabetes mellitus gestacional (GDM, por sus siglas en inglés) y diabetes secundaria a otras condiciones.

El tipo de mayor incidencia en la población es la NIDDM o diabetes tipo II con el 90 a 95 % del total de los casos reportados, se caracteriza por la resistencia, por parte del cuerpo, a la insulina o por un defecto en la secreción de la misma (Dean y McEntyre, 2004). Sin embargo, muchas poblaciones están caracterizadas no solo por la resistencia a la insulina sino además por la insulinopenia (pérdida de la función de las células β). Histológicamente, la pérdida de la función de las células β del páncreas en la diabetes

mellitus tipo II, está asociada a una deposición amiloide dentro de los islotes de Langerhans. Este tipo de diabetes comprende un desorden poligénico heterogéneo y, aparece, generalmente, en adultos obesos y en formas raras de enfermedades hereditarias (Nussey y Whitehead, 2001).

La NIDDM tiene un componente hereditario, el cual no ha sido completamente clarificado. La resistencia a la insulina puede alcanzarse como resultado de mutaciones en el receptor en sí, para lo cual existen varios fenotipos inusuales. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la resistencia a la insulina es manifestada como cambios en las vías de señalización distal al receptor (Nussey y Whitehead, 2001).

El segundo tipo de mayor incidencia es la IDDM o diabetes tipo I con el 5 a 10 % del total de los casos reportados. Es considerada como una enfermedad autoinmune dependiente de los linfocitos T, caracterizada por la infiltración y destrucción de las células β de los islotes de Langerhans: la unidad endocrina del páncreas. La iniciación y promulgación del proceso destructivo permanece pobremente entendido y, las asociaciones genéticas, los factores ambientales y la reacción inmune son consideradas agentes causativos. Se considera que los elementos genéticos conforman aproximadamente el 40% de la susceptibilidad a la enfermedad (Nussey y Whitehead, 2001). Este tipo, ocurre más comúnmente en jóvenes debido al determinante genético y la iniciación del daño de los islotes que ocurre en humanos, y el principal desencadenante de la enfermedad es una infección oral como la rubéola congénita, el principal precipitante de la enfermedad (Dean y Mc Entyre, 2004).

1.2 Absorción intestinal

Este movimiento de monosacáridos desde el lumen del intestino delgado a la sangre es un proceso transcelular en dos pasos (Figura 1). El primer paso, implica el ingreso de los

monosacáridos del lumen al interior de las células epiteliales del intestino, lo cual es llevado a cabo por proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana de la superficie apical de dichas células. El segundo paso, consiste en exportar las moléculas de monosacáridos desde las células intestinales a la sangre, a través de transportadores que se encuentran en la membrana basolateral de dichas células.

El yeyuno, la zona intermedia del intestino delgado, está constituido por varias capas celulares. En el epitelio, se encuentran unas células denominadas enterocitos, las cuales, poseen alrededor de 600 microvellosidades recubiertas por una estructura fibrosa. En la membrana de los enterocitos, hay numerosas enzimas y otras proteínas no enzimáticas, como transportadores o receptores de diversas sustancias, encargadas de su principal función, la absorción de nutrientes. (Tresquerres, 1999).

El área de absorción de la membrana plasmática de las células epiteliales del intestino, está incrementada por válvulas conniventes, vellosidades y miles de microvellosidades, las cuales se extienden como delgadas proyecciones desde la superficie apical de cada célula (Figura 1). Tales microvellosidades pueden incrementar 25 veces el área de absorción, destacando así su capacidad de transporte (Johnson y col, 2002).

Los enterocitos, contienen una gran variedad de sistemas de simporte (transportadores acoplados, que transfieren simultáneamente dos solutos en la misma dirección), que son dirigidos por un gradiente de sodio (Na^+) a través de la membrana plasmática; cada sistema es específico para transportar un pequeño grupo de azúcares o aminoácidos parecidos hacia el interior de la célula. Debido a que el Na^+ tiende a moverse hacia el interior de la célula gracias a un gradiente electroquímico, el azúcar o aminoácido es “arrastrado” hacia la célula con él. (Johnson y col, 2002).

El ingreso de la glucosa del lumen al interior de los enterocitos, es llevado a cabo por el co-transportador sodio/glucosa (SGLT1) un transportador de alta afinidad y baja capacidad para la glucosa (Zhang y col, 2005). SGLT1 es una proteína con 662 aminoácidos que forma 12 alfa-hélices transmembrana con el amino (N-) y carboxilo (C-) terminal dirigidos hacia el citosol. El C- terminal esta formado por 5 alfa-hélices que permiten la permeabilidad a la glucosa; el resto de la proteína posee dos sitios de unión encargados de transportar dos iones Na^+ .

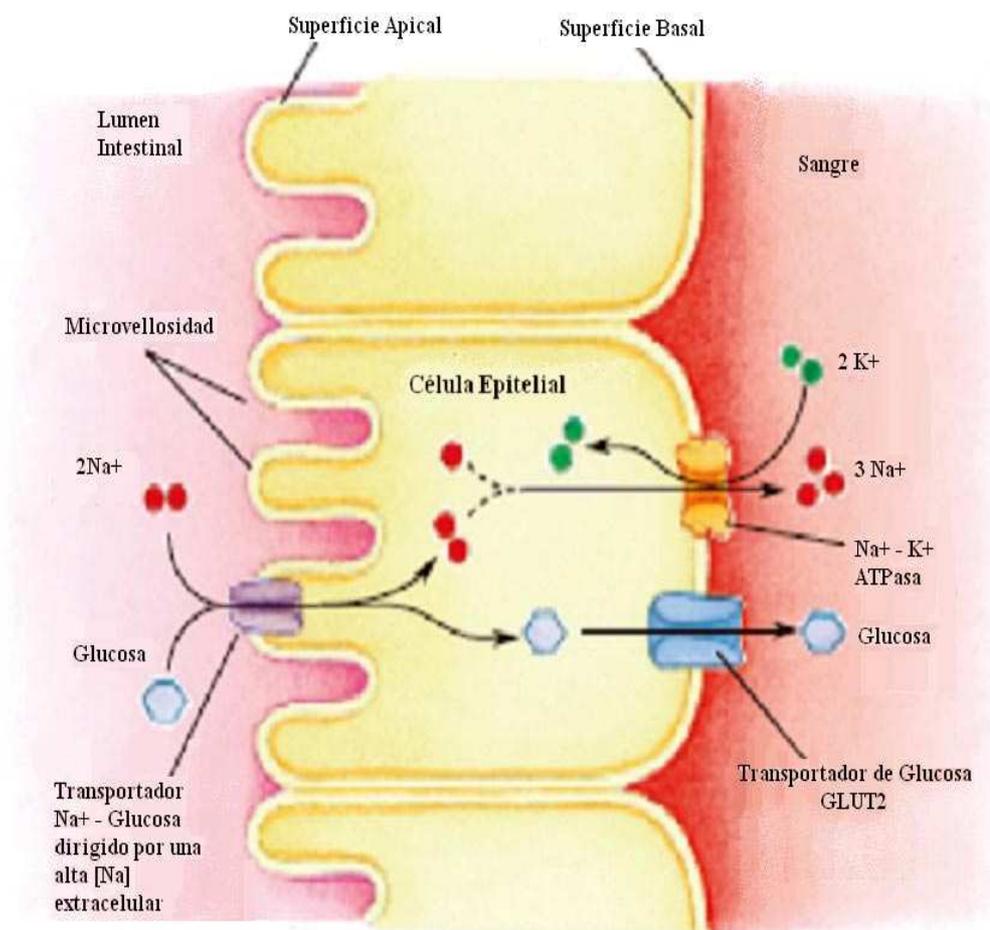


Figura 1. Transporte de Glucosa en las células epiteliales del intestino (SGLT1). La Glucosa es cotransportada con Na^+ a través de la membrana plasmática apical hacia el interior de la célula epitelial. Se mueve a través de la célula hasta la superficie basal de la misma, en donde, pasa a la sangre vía GLUT2, un transportador pasivo de glucosa. La Na^+ - K^+ ATPasa continúa bombeando Na^+ hacia fuera de la célula para mantener el gradiente de Na^+ que dirige la incorporación de glucosa.

Para el SGLT1, la unión del Na^+ y la glucosa es cooperativa: la unión de cualquiera de los ligandos induce un cambio conformacional que incrementa grandemente la afinidad de la proteína por el otro ligando, siendo éste el paso limitante en la cinética del transportador (Aoshima y col, 1997).

La última etapa en la absorción de glucosa, es el paso de la misma al torrente sanguíneo. La glucosa concentrada en el interior de las células intestinales es exportada, a favor de un gradiente de concentración, a la sangre a través de proteínas transportadoras que se encuentran en la membrana basolateral de la célula. Este transportador es denominado GLUT2 y consisten de una única cadena polipeptídica de 500 residuos, con un peso molecular de 45 KD (Berg y col, 2002) y se expresan tanto en la membrana basolateral de los enterocitos, como en las células β del páncreas, en hígado y riñón (Nusse y Whitehead, 2001)

El GLUT2, es distintivo por tener un valor muy alto de K_M para la glucosa, con lo cual se asegura que el mismo pase rápidamente a la sangre, aun cuando exista una gran concentración de ella en la célula epitelial, es decir, el GLUT2 se satura a una concentración elevada de glucosa. Además, este transportador aun siendo específico para la glucosa, puede transportar a sus isómeros como D-manosa y D-galactosa. Por tanto, el GLUT2 presenta las tres características distintivas de un transportador pasivo: tasas altas de difusión a favor de un gradiente de concentración, saturabilidad y especificidad (Lodish y col, 2000)

1.3 Glicemia

El nivel de glucosa en la sangre o glicemia varía, dentro de unos límites estrechos, dependiendo de las necesidades del organismo, por medio de la regulación, principalmente, de hormonas secretadas por el páncreas: la insulina, hormona que es liberada cuando la

glicemia es alta y que causa la estimulación en diferentes tejidos para que capten la glucosa de la sangre, y el glucagon, hormona que es liberada cuando la glicemia es baja y que causa, en el hígado, la degradación del glucógeno a glucosa (Dean y Mc Entyre, 2004).

La insulina humana, es una proteína de 51 aminoácidos (peso molecular 57 KD), sintetizada en las células β de los islotes pancreáticos y, es secretada en respuesta a un incremento en la concentración extracelular de glucosa. Cerca del 50% de la insulina liberada es captada por el hígado, el resto, pasa a los tejidos periféricos (Nussey y Whitehead, 2001).

La detección de cambios en la concentración de glucosa es facilitada por la presencia de canales que contienen fluido intersticial a lo largo de las superficies laterales de las células β vecinas. Concentrado en las microvellosidades de estos canales se encuentra el transportador GLUT2, el cual permite que la concentración de glucosa en las células β , sea esencialmente la misma que en el fluido intersticial.

El glucagón es una proteína de 29 aminoácidos (34.5 KD), sintetizada en las células α del páncreas y, su secreción es estimulada por una reducción en la concentración de glucosa en sangre y por comidas proteicas, particularmente rica en aminoácidos: alanina y arginina. Estas respuestas secretorias son suprimidas al mínimo, por la presencia de insulina y glucosa. Así, la ingesta de alimentos, produce una menor variación en la secreción de glucagón que en la de insulina, debido al efecto inhibitorio de la insulina sobre la liberación del glucagon (Nussey y Whitehead, 2001).

La cantidad de glucosa en la sangre depende de los mecanismos que la aportan y de aquellos que la retiran. Entre los que aportan glucosa a la sangre se encuentran tres mecanismos: la absorción de carbohidratos dietarios, la degradación del glucógeno

(glucogenólisis, Figura 2) y la síntesis hepática de glucosa (neoglucogénesis), mientras que la glucosa es retirada de la sangre gracias a la captación por parte de los tejidos periféricos. Al comer, la glicemia aumenta, dependiendo del tipo y la cantidad de carbohidratos consumidos. La glucosa ingerida, es entonces absorbida por el intestino y llevada hacia la sangre (Dean y Mc Entyre, 2004).

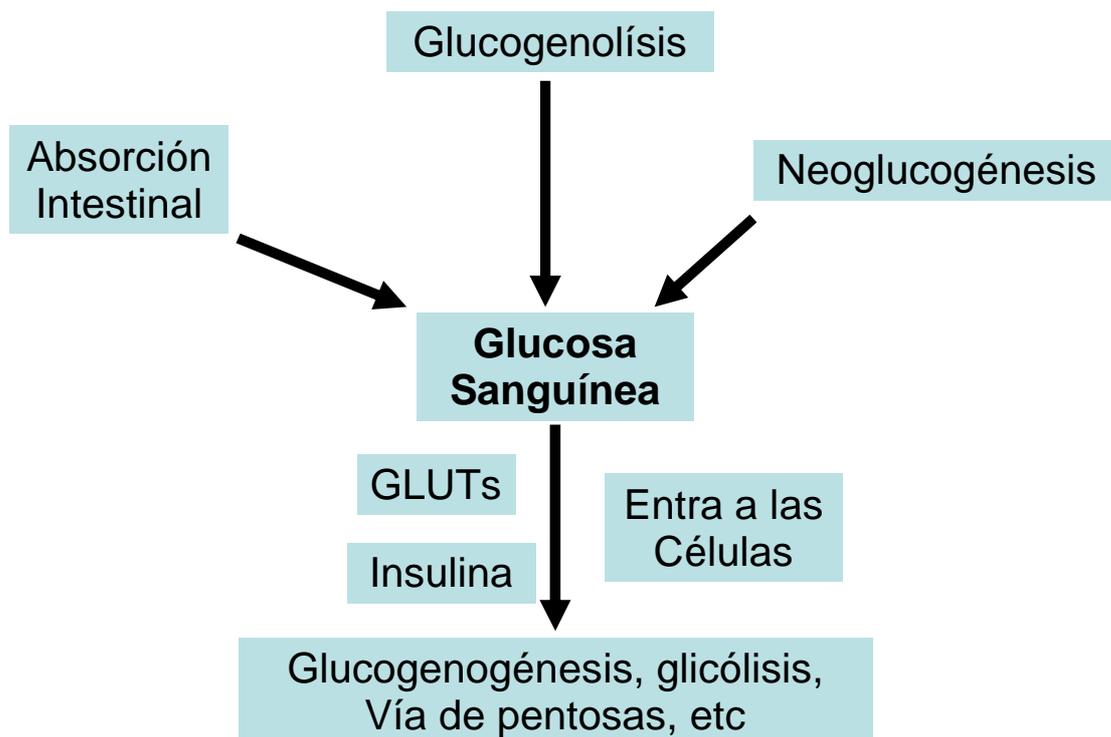


Figura 2. Origen y destino de la glucosa sanguínea.

1.4 *Bauhinia megalandra*

B. megalandra o como se le conoce popularmente en Venezuela “pata de vaca”, “casco de vaca” o “pata de cabra”, pertenece a la familia Fabaceae, que comprende las leguminosas. Dicha familia esta constituida por muchas especies distribuidas en más de 600 géneros. En Venezuela existen alrededor de 161 géneros ampliamente distribuidos por el territorio nacional (Hokche, 2007).

El nombre coloquial que se le da a *B. megalandra* de “pata de vaca” o “casco de vaca”, es debido a su semejanza a las pezuñas de estos animales, ya que sus hojas están profundamente divididas en dos, son plantas ornamentales, por lo que se le puede encontrar en jardines o parques, igualmente son de fácil propagación por semilla (Aristigueta, 1962).

B. megalandra es una especie autóctona, y se caracteriza por tener un tipo de vida arbóreo pudiendo alcanzar los 10 metros de altura, dependiendo de las condiciones de crecimiento a la cual este sometida. Las hojas son bien desarrolladas y grandes, siempre verdes, y están divididas desde el ápice hasta mas o menos un tercio de su longitud (Hoyos, 1978).

El genero *Bauhinia* es hermafrodita, presenta flores blancas en racimos o solitarias, el fruto se encuentra como legumbre compacta de color marrón, además de tener un crecimiento rápido y ser de vida larga tiene un sistema radical profundo (Hoyos, 1978).

1.4.1 Antecedentes del genero *Bauhinia*

De investigaciones realizadas al genero *Bauhinia*, los autores han reportado que son varias las especies de este genero que poseen propiedades hipoglicemiantes en animales con diabetes inducida, estas investigaciones en parte se debieron a la creencia de los pueblos de que ciertos componentes de la planta son capaces de reducir los niveles de glucosa en sangre en personas que sufren de diabetes tipo II (no insulino dependientes).

Silva y col (2002) y Pepato y col. (2002), trabajando con el extracto acuoso de *B. forticata*, encontraron que la fracción butanólica disminuía significativamente los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas.

Por otro lado Lemus y col. (1999) encontraron que el extracto de hojas secas de *B. candidas* producía un efecto hipoglicemiante en ratas a las que se les indujo diabetes.

Igualmente González-Mujica y col. (1998) reportaron que el extracto acuoso de hojas secas de *B. megalandra* era capaz de inhibir la neoglucogenesis en hígado de ratas, probablemente por inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa

Estrada y col. (2005) utilizando hojas frescas de *B. megalandra*, obtuvieron un extracto metanólico del cual lograron aislar un flavonoide quercitina 3-O- α -(2''-galloyl) ramnosido, el cual mostró una capacidad para inhibir (dependiente de la concentración) la neoglucogenesis en hígado de rata. (González-Mújica y col., 2005).

1.5 Flavonoides

En todas las plantas superiores se encuentran compuestos fenólicos los cuales generalmente presentan grupos funcionales oxigenados que en la mayoría de los casos son grupos aromáticos, dentro de este grupo de compuestos fenólicos los flavonoides y sus derivados son los mas abundantes entre los compuestos de bajo peso molecular, frecuentemente se encuentran asociados con azucares y están presentes tanto en el reino vegetal como en el animal (Marcano y Hasegawa, 1991).

Los flavonoides son polifenoles y se han identificado mas de cuatro mil tipos químicamente diferentes (Middleton y col., 2000). Su estructura comprende un anillo A derivado de la cadena policétida, un anillo B derivado del ácido shikímico, con sustitución en orto, y tres átomos de carbono que unen a los anillos A y B, correspondiente a la parte alquilada del fenilpropano (Figura 3). Estos pueden formar un heterociclo (más abundante) o una cadena abierta (chalconas). La proporción de oxígeno varia y puede estar con OH, metoxi, dioximetileno y aun formando glicósido (Marcano y Hasegawa, 1991).

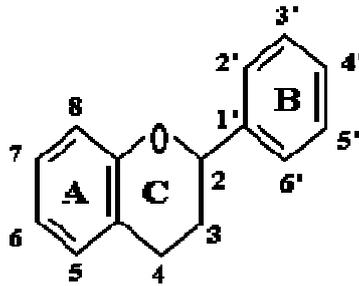


Figura 3. Estructura básica de un flavonoide

1.5.1 Tipos

Entre los distintos tipos de flavonoides pertenecientes al grupo de compuestos fenólicos de bajo peso molecular tenemos:

Las chalconas contienen el anillo A hidroxilado en el C-3 y C-4 y estos son los responsables de la pigmentación amarilla de las flores (Figura 4). La floricina es una charcona ampliamente distribuida en cortezas de frutos de varias rosáceas y esta produce una glucosuria causada por la interferencia en la reabsorción de la glucosa por los túbulos renales. Las Auronas posiblemente derivan de las charconas por ciclación oxidativa con el C-2 (Figura 5).

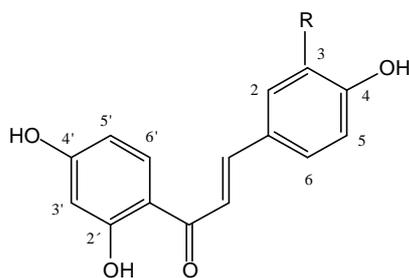


Figura 4. Estructura química de una Chalcona

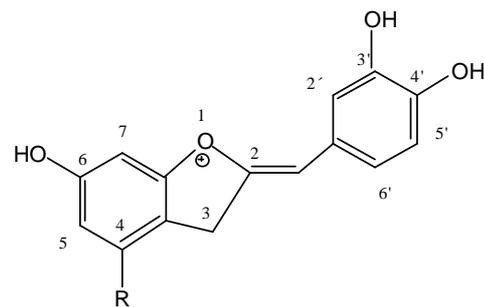


Figura 5. Estructura química de una Aurona

Los Flavonoles (Figura 10) y Flavonas (Figura 6) son los más abundantes y se encuentran libres o formando glicosidos, los compuestos más comunes de este grupo son la apigenina, luteonina, quercetina, rutina y canferol.

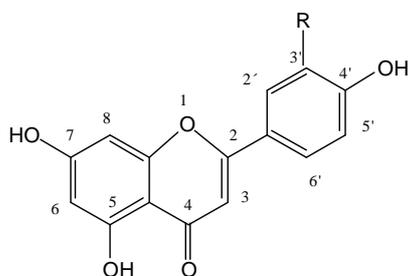


Figura 6. Estructura química de una flavona

Las Antocianinas forman parte de los principales pigmentos de flores y hojas que van desde el color rojo hasta el azul, son glicósidos en los cuales la unión glicosídica esta principalmente en el C-3 (Figura 7).

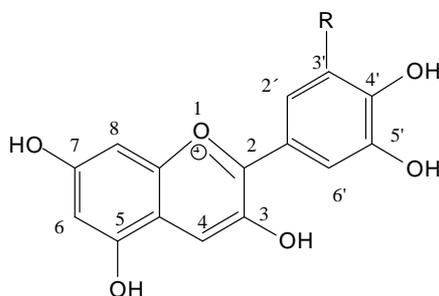


Figura 7. Estructura química de Antocianinas

Las Flavanonas (Figura 8) pueden presentarse como O y C-glicósido y también pueden tener O y C-Metilaciones o alquilaciones. Una de las agliconas más representativas es la naríngenina.

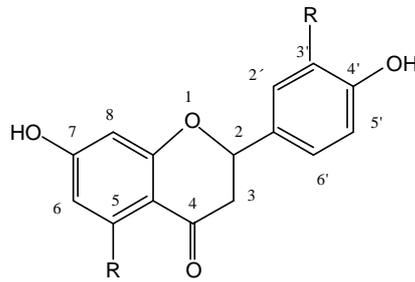


Figura 8. Estructura química de una flavanona

Los Flavanoles (Figura 9) presentan dos carbonos asimétricos 2 y 3, e incluyen polioxigenación en los anillos A y B y glicosidación.

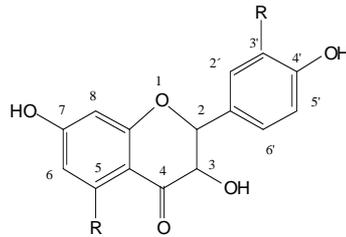


Figura 9. Estructura química de un flavanoneol

Los Flavonoles (Figura 10) poseen el esqueleto de flavano con uno o dos grupos OH en el anillo heterocíclico.

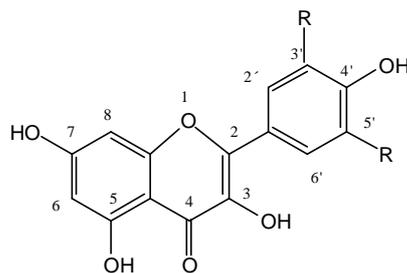


Figura 10. Estructura química de un flavonol

Los Taninos (Figura 11) son flavonoides de alto peso molecular y se conocen también como proantocianidinas y son responsables de un gran número de reacciones, por

ejemplo la precipitaron de polisacáridos y proteínas. A pesar de su complejidad estructural se extraen con agua ya que son altamente oxigenados y presentan azúcares en su composición que le dan carácter hidrofílico.

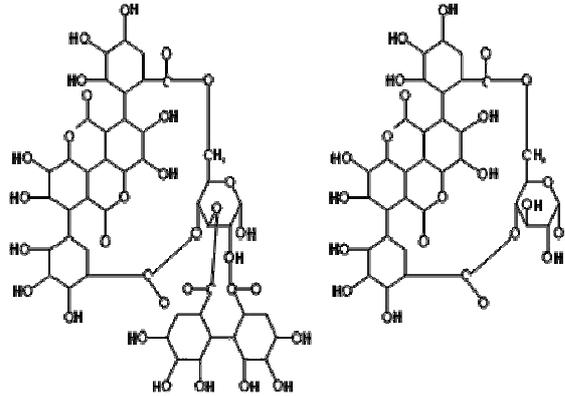


Figura 11. Estructura química de Taninos

Los isoflavonoides (Figura 12) se distribuyen principalmente en la familia de las leguminosas y se les puede dividir en varias clases de acuerdo a los niveles de oxidación del anillo central y a la complejidad del esqueleto (Marcano y Hasegawa, 1991).

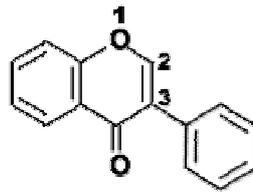


Figura 12. Estructura química de un Isoflavonoide

1.5.2 Antecedentes

Varios han sido los estudios realizados y reportados en donde los flavonoides glicosilados han sido capaces de inhibir al cotransportador sodio-glucosa (SGLT-1).

González-Mujica y col. (2003) reportaron que el extracto acuoso de las hojas de *B. megalandra* era capaz de inhibir la absorción intestinal de glucosa en una forma dependiente de la concentración, además de observar un efecto aditivo cuando se realizaba junto con floricina. Al usar vesículas de membrana de borde apical de enterocitos demostraron que el extracto de *B. megalandra* inhibe directamente al SGLT-1.

Igualmente Ader y col. (2001) sugieren que los flavonoides glicosilados Quercetina-3-glucósido y la Quercetina-4'-glucósido inhiben competitivamente el paso del metil- α -D-glucopiranososa mediado por el SGLT-1.

En el trabajo realizado por Li y col. (2005), encontraron que un flavonoide presente en frutas cítricas como lo es la naringenina inhibía significativamente la absorción de glucosa en el intestino de rata y de conejo.

Xioayan y col. (2006) estudiaron una serie de indol-O-glicosidos y C-glicosidos que fueron sintetizados y evaluados en un ensayo sobre el cotransportador SGLT-1 y SGLT-2, ellos encontraron que dos compuestos sintetizados mostraron ser potentes inhibidores del SGLT-2.

Daubront y col. (2009) obtuvieron apigenina glicosilada a partir del extracto metanolico de *B. megalandra*, el cual mostró ser un inhibidor de la absorción intestinal de glucosa.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- ✓ Identificar el compuesto presente en el extracto de *Bauhinia megalandra*, responsables de la inhibición de la absorción intestinal de glucosa.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Fraccionamiento del extracto de las hojas de *B. megalandra* con la finalidad de obtener la molécula responsable de la inhibición de absorción de glucosa a nivel intestinal.
- ✓ Establecer las condiciones para la separación por métodos cromatograficos de los compuestos presentes en el extracto de la planta.
- ✓ Aislar y purificar los compuestos presentes en el extracto de la planta.
- ✓ Identificar los compuestos obtenidos por el método espectroscópico de resonancia magnética nuclear RMN-¹H y RMN-¹³C.
- ✓ Evaluar el posible efecto inhibitorio de los compuestos puros obtenidos del extracto de la planta sobre la absorción intestinal.
- ✓ Determinar el punto de saturación de la absorción intestinal de glucosa.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Animales

Se empleo ratas machos de la cepa Sprague-Dawley, con un peso comprendido entre 180 y 220 g que fueron suministrados por el Bioterio Emilia Pérez-Ayuso del instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UCV.

3.1.2 Material Vegetal

Las hojas de la planta de *B. megalandra* fueron recolectadas en Octubre del 2008 en la Universidad Central de Venezuela, identificada por el Dr. Stephen Tillet, del Herbario Ovalles de la Facultad de Farmacia de la UCV.

3.1.3 Material Químico

Los materiales químicos utilizados fueron de grado analítico, adquiridos principalmente de las casas comerciales Merck KgaA (Alemania), Sigma (USA), Aldrich (USA), etc. Algunos de los solventes utilizados fueron metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, diclorometano, entre otros.

Para la realización de la Cromatografía de Capa Fina (CCF) se utilizó placas analíticas de sílica gel 60, sobre un soporte de aluminio, 0,25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia UV₂₅₄ marca POLYGRAM[®].

Para la Cromatografía en Columna (CC), se usó como fase estacionaria sílica gel 60, 0.016-0,2 mm (70-230 mesh ASTM).

3.1.4 Equipos

- Rotavapor marca Yamato, modelo BM100.
- Un Espectrofotómetro marca Novaspeck II.

- Espectrofotómetro modelo DU 600 Beckman.
- Sonicador, modelo MSE.
- Cromatógrafo de Contracorriente de alta velocidad, marca P.C Inc., modelo HSCCC serie 400, con un rotor enrollado de tubería de teflón de 1,6 mm de diámetro interno y 320 mL de capacidad.
- Lámpara de UV marca ULTRA-VIOLET PRODUCTS INC. CROMATO VUE. modelo CC-20.
- Espectrómetro con detección por cuadratura marca JEOL, modelo 270, campo de aplicación de 270 MHz para RMN-[¹H] y 67,5 MHz para RMN-[¹³C].

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación del extracto vegetal

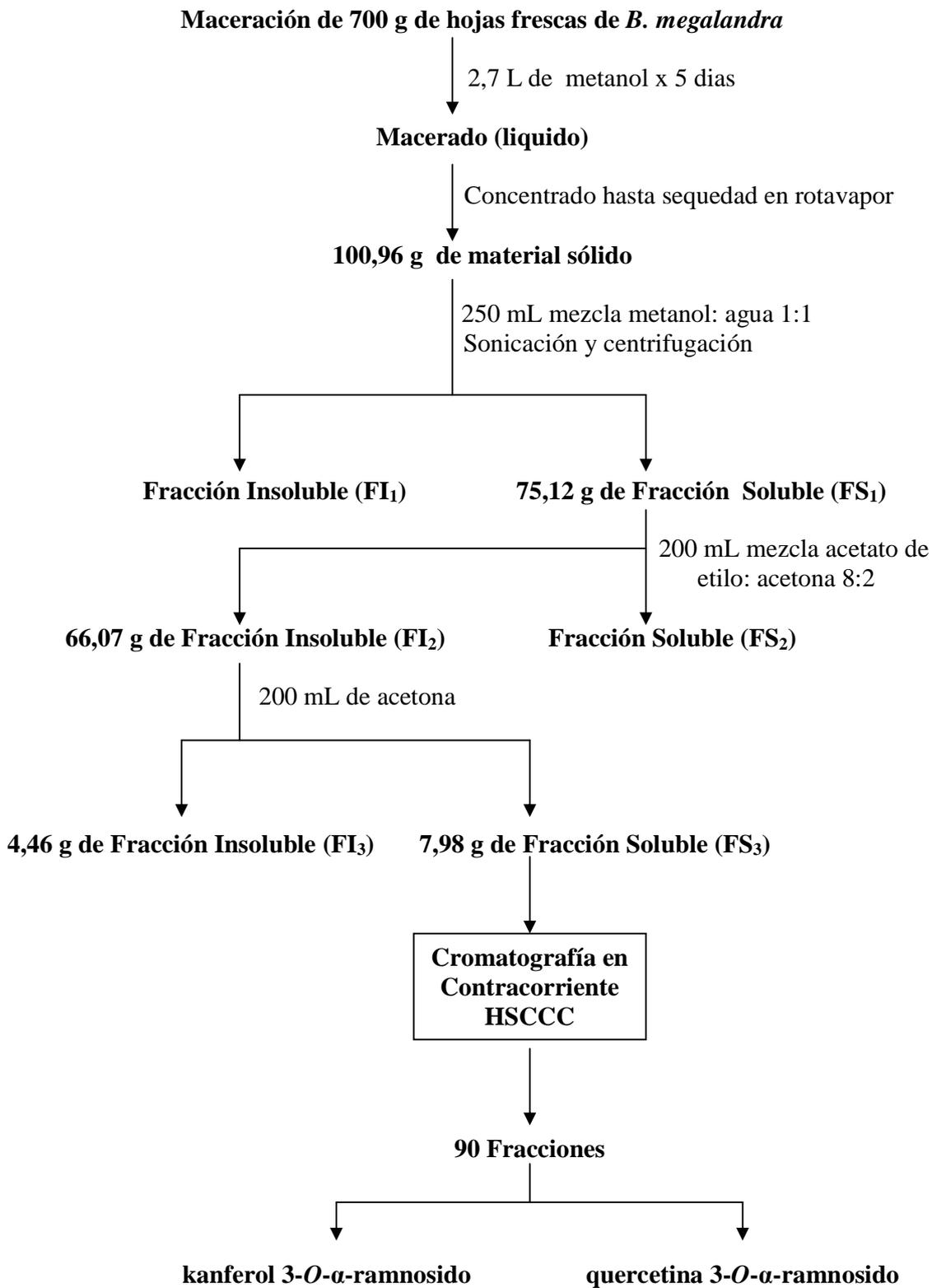
Se maceraron, por 5 días, 700 g de hojas frescas de *B. megalandra* en 2,7 L de metanol, el material líquido fue concentrado hasta sequedad en un rotavapor (el solvente recuperado se reutilizó nuevamente en las hojas) y dió un peso de 100,96 g, de apariencia viscosa y color verde.

A el sólido resultante se le agregó 250 mL de una mezcla metanol: agua (1:1) y se sometió a sonicación por una hora, luego se centrifugó a 17000 rpm durante 18 min, este proceso se realizó dos veces mas. Por este procedimiento se obtuvo dos fracciones: una insoluble (FI₁), que se almacenó, y otra soluble (FS₁), que luego de concentrarse hasta sequedad peso 75,12 g y era de apariencia viscosa y color marrón verdoso.

A la fracción FS₁ se le realizó una extracción con 200 mL de una mezcla de acetato de etilo: acetona (8:2) y centrifugándose como antes se obtuvo dos fracciones: una soluble (FS₂), concentrada hasta sequedad y luego guardada a 5°C, la otra insoluble (FI₂), que peso 66,07 g, de apariencia arcillosa color marrón.

Por ultimo a FI₂ se le realizó una extracción con 200 mL de acetona luego se colocó en agitación por una hora, se dejó en reposo por un lapso de 24 h y después se separó por decantación, la fase soluble que se obtuvo fue concentrada hasta sequedad. Este mismo proceso se realizo 6 veces consecutivas, de ahí se obtuvo dos fracciones finales, una insoluble (FI₃), peso 4,46 g, de apariencia arcillosa y una soluble (FS₃), que luego de ser concentrado hasta sequedad peso 7,98 g y era de apariencia pastosa y color marrón verdoso.

Figura 13. Procesamiento del material vegetal



3.2.2 Métodos Cromatográficos

3.2.2.1 Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Las CCF se realizaron sembrando en las placas de sílica gel 60 un aproximado de 10 μL por cada muestra, cada una disuelta en un volumen de solvente apropiado como por ejemplo metanol, diclorometano, acetona, etanol, n-butanol, etc, utilizando capilares para su aplicación. Las placas sembradas con las distintas muestras fueron corridas en una cámara, utilizando como fase móvil distintas mezclas de solventes en distintas proporciones, hasta que alcanzaron una distancia cerca del borde de la placa luego del cual fueron retirados de la cámara y se dejaron secar a temperatura ambiente.

A las placas de CCF iluminándolas con una lámpara de UV a dos longitudes de onda ($\lambda = 254$ y 366 nm) se pudo observar los compuestos presentes. Además se utilizó dos métodos para el revelado de las placas de CCF, el primero consistió en rociarlas con una solución saturada de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado diluido 1:1 con metanol, al momento de ser usado, luego de lo cual la placa de CCF se calentó a una temperatura adecuada por aproximadamente 15 minutos. El uso de esta solución reveladora indica la presencia de flavonoides (color amarillo) y terpenoides (color rojizo, morado o azul). El segundo método que se empleó fue el uso de una cámara con yodo en el cual se puede observar la presencia de los compuestos orgánicos, por una coloración amarilla oscura.

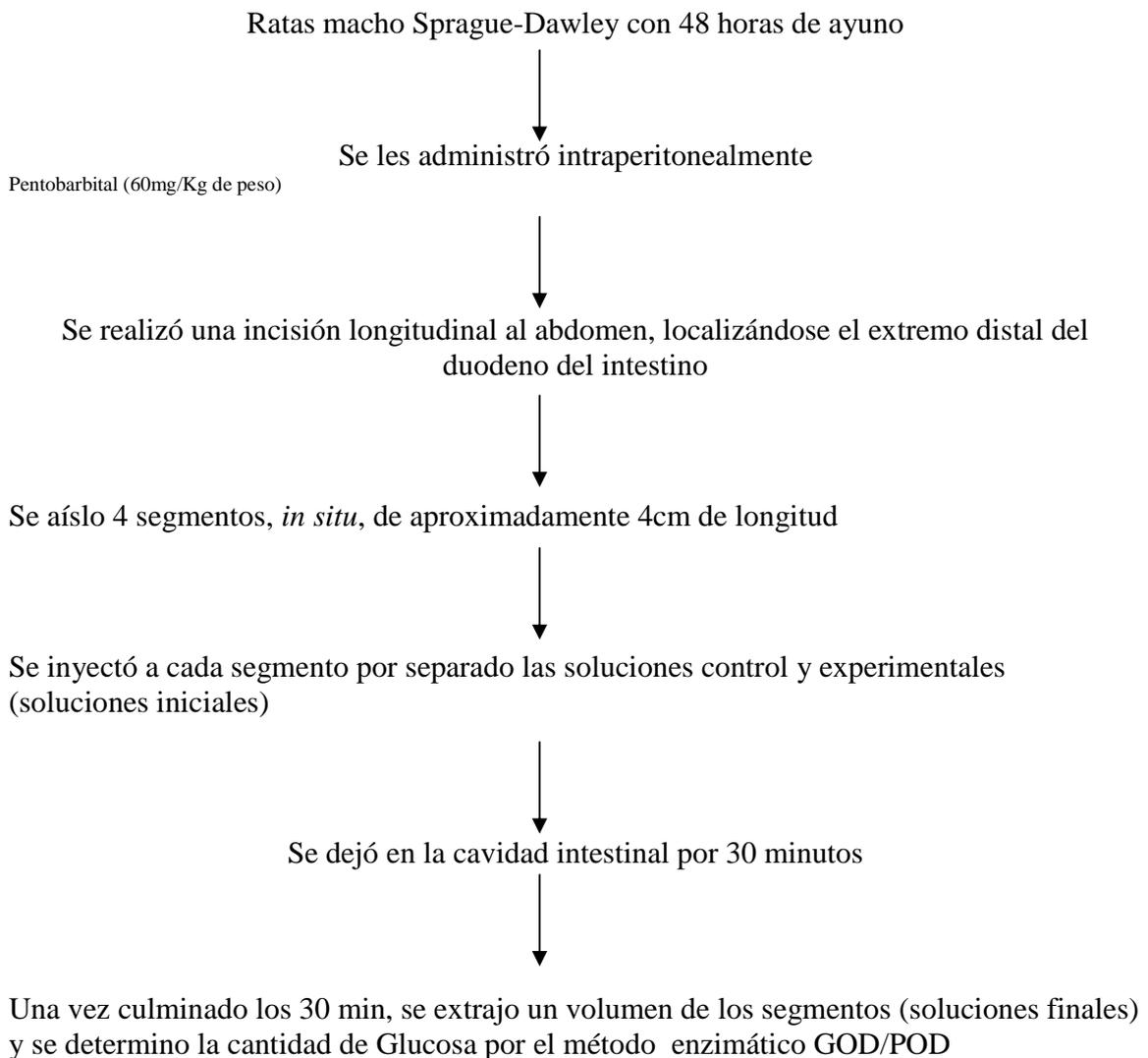
3.2.2.2 Sistema de contracorriente

El método de Cromatografía de contracorriente se basa en el principio de partición de una sustancia en un sistema líquido-líquido. Para ello se empleó un sistema de solventes de dos fases, una rica en solvente orgánico con el que se eluyó la muestra y otra fase rica en agua que constituyó la fase estacionaria mantenida en la columna.

- ✓ Experimentales: Glucosa 10 mM
 NaCl 0,9%
 DMSO 2%
 Extracto o compuesto aislado

Luego de 30 minutos, se procedió a extraer un volumen (soluciones finales) de cada segmento de intestino con ayuda de una inyectora para insulina (1mL) y luego con dichas soluciones iniciales y finales se determinó la cantidad de glucosa presente usando para ello el método enzimático GOD/POD (método de la glucosa-oxidasa)(Trinder, 1969).

Figura 14. Absorción intestinal de glucosa



3.2.5 Determinación del punto de saturación de la absorción intestinal de glucosa

Se determinó la absorción intestinal de glucosa utilizando concentraciones crecientes de la misma (12,5-50 mM), siguiendo la metodología antes descrita, con la única modificación de que se redujo el tiempo de absorción intestinal de glucosa de 30 min a 15 min con la finalidad de asegurar que se estuviese observando, en pleno, el proceso de absorción intestinal de glucosa y no la etapa final del mismo. Los parámetros cinéticos fueron calculados usando el programa Enzfitter (Leather, 1987).

3.2.6 Efecto de la adición de Floricina

Se midió el efecto de la Floricina y adicionándose la misma junto con el compuesto aislado, para determinar el efecto aditivo sobre la inhibición de la absorción intestinal de glucosa. El ensayo se realizó siguiendo la metodología de la Figura 14.

3.2.7 Método enzimático GOD/POD

3.2.7.1 Fundamento

Este método se basa en la detección por colorimetría de un compuesto de color rosado que se hace presente luego de que la glucosa, en presencia de agua y oxígeno por acción de la enzima glucosa oxidasa, se transforma en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último se reduce, mientras que el fenol y la 4-aminoantipirina se oxidan en presencia de la enzima peroxidasa para generar agua y un cromóforo con estructura de quinonaimina que presenta un máximo de absorción a 510 nm (Figura 15).

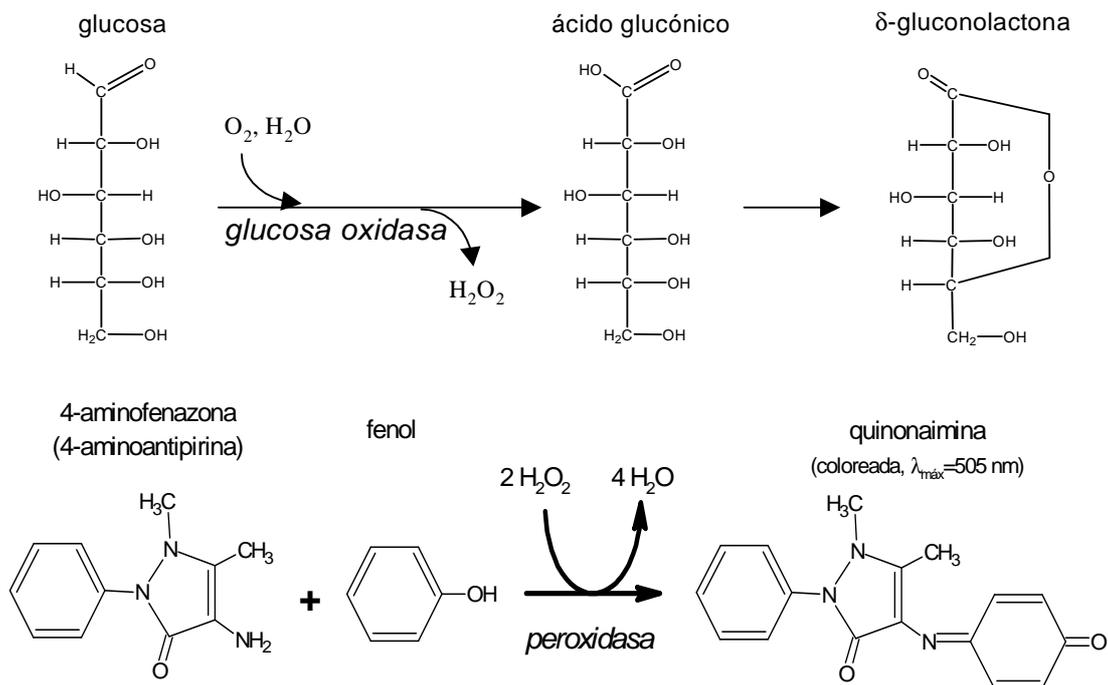


Figura 15. Método de GOD/POD. La glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucónico con la formación de peróxido de hidrógeno. Éste, en presencia de la peroxidasa produce la oxidación en la que se une la 4-aminoantipirina y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la cantidad de glucosa inicial.

3.2.7.2 Ensayo

Se tomó 10 μ L de las soluciones iniciales control y experimentales y 10 μ L de las soluciones finales control y experimentales (después de transcurrido los 30 min) y se colocaron cada uno en tubos de ensayo por duplicado, luego se le adicionó a cada tubo 1 mL del reactivo glucosa oxidasa, conjuntamente a esto se preparó un blanco y un patron, posteriormente dichos tubos fueron incubados a 37°C por 10 minutos para que se realizara la reacción y se desarrollara el color característico y proceder a leer la absorbancia de cada tubo a 510 nm. Por último se procedió a estimar la cantidad, por diferencia, de μ moles de glucosa absorbida.

4. RESULTADOS

El estudio fitoquímico de la planta *B. megalandra*, se realizó guiado por bioensayos, como se muestra en la Figura 14. La fracción FI₂ obtenida del extracto metánolico de las hojas de la planta mostró un 6,74 % de inhibición sobre la absorción intestinal de glucosa (Figura 16) en comparación con la casi ausencia de efecto de FS₂ (resultado no mostrado), motivo por el cual FI₂ fue la que se continuo fraccionando. La fracción FI₃ exhibió una actividad inhibitoria sobre la absorción intestinal de glucosa similar a la observada al usar FI₂, por el contrario FS₃ inhibió en aproximadamente un 43 % la absorción intestinal de glucosa (Figura 16). Por los resultados anteriores, se seleccionó la fracción FS₃ para su posterior fraccionamiento por el método cromatográfico de contracorriente.

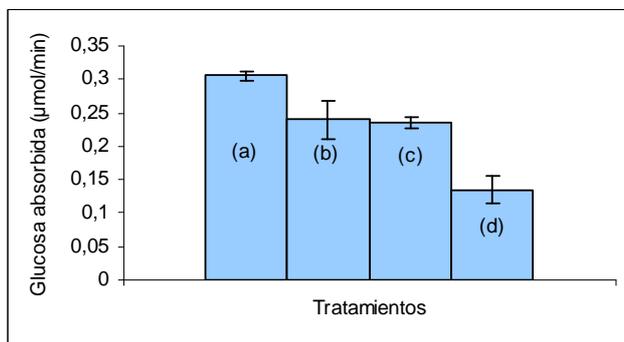


Figura 16. Efecto de los fracciones FI₂, FI₃ y FS₃ de *B. megalandra* sobre la absorción intestinal de glucosa en ratas. En el animal anestesiado se aislaron 4 segmentos intestinales, *in situ*, luego en los cuales se inyectó, en todos los segmentos, 1 mL de una solución que contenía NaCl 0,9 %, glucosa 10 mM, DMSO 2%: (a) control; (b) en adición 1 mg/ml FI₂; (c) en adición 1 mg/ml FI₃, (d) en adición 1 mg/ml FS₃; luego de 30 min se determinó la cantidad de glucosa absorbida. Los resultados corresponden a los promedios ± D.E de 3 experimentos.

Para la separación de los compuestos presentes en la fracción FS₃, por contracorriente, se procedió primeramente a buscar la mezcla de solventes adecuada que separara los compuestos presentes en esa fracción, esto se hizo por medio de cromatografía en capa fina (CCF). Se probó distintas mezclas de solventes orgánicos, como por ejemplo,

cloroformo: metanol: agua, en proporción de 4: 3,5: 2 v/v, con esta mezcla se observó la formación de dos fases, una orgánica y otra acuosa, y para la realización de la CCF se tomó como fase móvil la orgánica. Luego bajo una lámpara de UV/visible se observó en la placa la separación de los compuestos presentes en FS₃, además se reveló la placa con sulfato cerico, con lo cual se evidenció la presencia de flavonoides, además de otros compuestos como terpenoides. Si bien esta mezcla fue buena para la observación de los diversos compuestos en FS₃, no lo fue así para la separación de los flavonoides.

Otra mezcla de solventes ensayada fue: cloroformo: n-butanol: metanol: agua en proporción de 4: 0,5: 3: 2, la cual resultó ser mejor para la separación en CCF de los compuestos presentes en FS₃, evidenciado por el revelado con sulfato cerico la presencia de flavonoides con una mejor separación al obtenido con la anterior mezcla de solventes. Por lo antes mencionado se consideró que esta última mezcla ensayada es la más adecuada para la separación por contracorriente.

El curso de cómo se llevo a cabo el proceso de la cromatografía en contracorriente se resume de la siguiente manera:

- ✓ Mezcla de los solventes: 80 mL de CHCl₃
10 mL de n-BuOH
60 mL de MeOH
40 mL de H₂O
- ✓ Separación de las fases (orgánica y acuosa).
- ✓ Desgasificación de la fase acuosa.
- ✓ Desgasificación de la fase orgánica.
- ✓ Llenado de la columna a 5 mL/min.
- ✓ Inyección estática de la muestra. Muestra disuelta 1:1 en fase orgánica y acuosa.
- ✓ Recolección de las distintas fracciones en tubos de ensayo.

- ✓ Frente de solvente 100 mL de fase estacionaria.
- ✓ Culminación del proceso.

Se inyectó al sistema 1,9484 g de FS₃ y el rendimiento obtenido por el sistema fue de 78,57%. Como resultado del proceso, se recogieron 90 fracciones, cada una con aproximadamente 5 mL, luego del cual se dejaron a temperatura ambiente hasta que se evaporó todo el solvente. Al final de lo cual se observó la formación de sólidos, en los primeros tubos los sólidos formados eran de coloración oscura, los siguientes eran de coloración rojiza hasta rosada, y los tubos restantes hubo formación de sólidos de coloración amarilla.

A las 90 fracciones se les realizó CCF para determinar que fracciones contenían los mismos compuestos y así poder unirlos. En la Tabla 1 se muestra la numeración de las fracciones correspondientes al orden en que se obtuvo.

Tabla 1. Uniones realizadas a partir de las 90 fracciones obtenidas del método cromatografico de contracorriente. Luego de la cromatografía de contracorriente se unieron las fracciones con compuestos similares de acuerdo a la observación y comparación de las CCF.

Uniones	Peso (mg)
1-2	31,14
3-12	5,18
13-23	44,76
24-27	13,62
28	3,01
29-37	36,97
38-50	149,40
51-62	46,46
63-71	50,75
72-87	81,19
88-90	38
91 (residuo)	37,24
Resto de Fase estacionaria	1303,44

Cuando se realizó la CCF a las fracciones F_{38-50} y F_{88-90} , usando como solvente la utilizada en la cromatografía en contracorriente, se observó en cada una de ellas la existencia de una sola “mancha” de coloración amarilla, con R_f diferentes por lo que se consideró que estaban bastante puras y se procedió a identificar el compuesto presente por el método espectroscópico RMN- $[^1H]$ y RMN- $[^{13}C]$.

El análisis de RMN, tanto de $[^1H]$, como de $[^{13}C]$, mostró señales características para dos tipos de flavonoides. En la fracción F_{38-50} , se evidenció un esqueleto flavonoidal con señales en las posiciones H-1'', (H-2', H-6' y H-3', H-5') y H-6'' para el espectro de protones, y en las posiciones C-4, C-4', C-5, C-7, C-2 y C-1'' para el espectro de carbono. Según los resultados el compuesto presente en F_{38-50} es kanferol 3-O- α -ramnosido (Figura 14).

En la fracción F_{88-90} las señales observadas fueron similares a las de kanferol 3-O- α -ramnosido, tanto para el espectro de protones como para el de carbono con la diferencia que la señal en la posición en H-3' no se observó, por lo que se identificó el compuesto presente en F_{88-90} como quercetina 3-O- α -ramnosido (Figura 17).

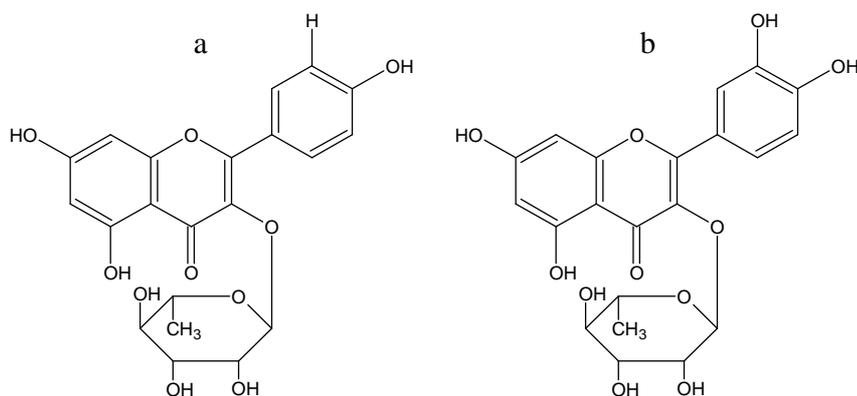


Figura 17. Estructura química de los flavonoides glicosilados: (a) kanferol 3-O- α -ramnosido y (b) quercetina 3-O- α -ramnosido.

Las demás uniones obtenidas de la cromatografía por contracorriente presentaron muchas manchas en las placas de CCF, por lo que sería necesario someterlas a otro método cromatográfico para purificar los compuestos presentes. Por lo antes mencionado no se les realizó la caracterización química por los métodos espectroscópicos, ni por ensayo biológico.

A los compuestos kanferol 3-*O*- α -ramnosido y quercetina 3-*O*- α -ramnosido se les evaluó el efecto sobre la absorción intestinal de glucosa junto con otro compuesto, kanferol 3-*O*- α -(2''-galoil) ramnosido, que se obtuvo a partir de *B. megalandra* por Estrada y col. (Estraday col. 2005). Los resultados de los bioensayos se muestran en la Figura 18.

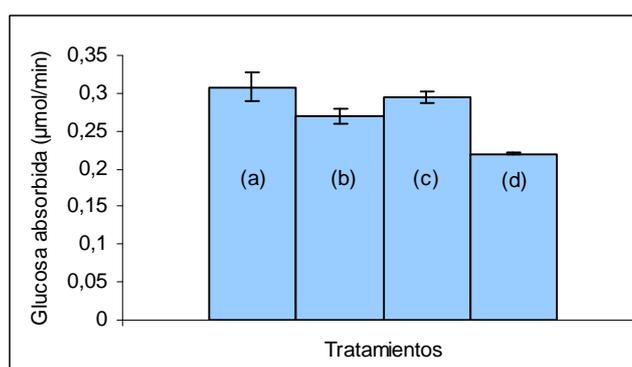


Figura 18. Efecto del Kanferol 3-*O*- α -ramnosido, Quercetina 3-*O*- α -ramnosido y Kanferol 3-*O*- α -(2''-galoil) ramnosido, sobre la absorción intestinal de glucosa en ratas. En el animal anestesiado se aislaron 4 segmentos intestinales, *in situ*, luego en los cuales se inyectó por separado 1 mL de la solución: NaCl 0,9% y glucosa 10 mM: (a) control, (b) en adición de Quercetina 3-*O*- α -ramnosido 50 mM, (c) en adición de Kanferol 3-*O*- α -(2''-galoil) ramnosido 50 mM y (e) en adición de Kanferol 3-*O*- α -ramnosido 50 mM; luego de 30 min se determinó la glucosa absorbida. Los resultados corresponden al promedio \pm D.E de 4 experimentos.

En la Figura 18, se aprecia que el kanferol 3-*O*- α -ramnosido, mostró la mayor actividad inhibitoria sobre la absorción intestinal de glucosa de los compuestos ensayados; se observó que en los segmentos intestinales controles se absorbió 0,30 μ mol/min de glucosa en comparación al valor de 0,21 μ mol/min absorbidos en presencia de 50 mM del

flavonoide, lo cual representa aproximadamente el 28% de inhibición de la absorción intestinal de glucosa

Una vez demostrado que el kanferol 3-*O*- α -ramnosido, proveniente de las hojas de *B. megalandra*, tiene un efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de glucosa, se determinó el efecto del mismo sobre los parámetros cinéticos de la absorción intestinal de glucosa, con la finalidad de establecer el tipo de inhibición generada por el kanferol 3-*O*- α -ramnosido.

Para la elaboración de la curva se prepararon soluciones con concentraciones crecientes de glucosa (12,5; 25; 37,5 y 50 mM) y se utilizó la metodología descrita en el Figura 14, con la modificación de que el tiempo que se permitió que la absorción intestinal ocurriera se redujo de 30 min a 15 min.

Se inyectó en cada segmento de intestino por separado 1 mL de una solución acuosa que contenía:

- Control: Glucosa 12,5; 25; 37,5 y 50 mM, por separado.
NaCl 0,9%.
- Experimental: Glucosa 12,5; 25; 37,5 y 50 mM, por separado.
kanferol 3-*O*- α -ramnosido 5 mM.
NaCl 9%.

Tabla 2. Influencia del kanferol 3-*O*- α -ramnosido sobre la cinética de la absorción intestinal de glucosa en ratas. Se inyectó en cada segmento de intestino por separado 1 mL de una solución que contenía NaCl 0,9 %, glucosa (12,5-50 mM) para el control, y en los experimentales se adicionó: kanferol 3-*O*- α -ramnosido 5 mM. Luego de 15 min se determinó la cantidad de glucosa absorbida. Los resultados corresponden al promedio \pm D.E de 4 experimentos. $P < 0,005^*$, $P < 0,5^{**}$, prueba de t de Student.

	K_M (mM)*	V_{MAX} (μ mol/ min)**
Control	38,93 \pm 4,92	42,33 \pm 5,02
Experimental	67,24 \pm 11,12	50,04 \pm 4,59

En la Tabla 2, se aprecia, que en presencia del kanferol 3-*O*- α -ramnosido hubo un incremento, estadísticamente significativo, en el valor del K_M , respecto al control, mientras que el valor de V_{MAX} varió de una manera estadísticamente no significativo, por lo que se podría sugerir que el efecto inhibitorio del kanferol 3-*O*- α -ramnosido sobre la absorción intestinal de glucosa es de tipo competitivo.

Adicionalmente se evaluó el efecto del kanferol 3-*O*- α -ramnosido en presencia de un conocido inhibidor del cotransportador SGLT1 como lo es la floricina (Panayatova-Heiermann y col, 1995), siguiendo la metodología descrita en la Figura 14 (Materiales y Métodos), con la finalidad de comprobar si existe algún efecto aditivo, de ambos compuestos, sobre la inhibición de la absorción intestinal de glucosa de manera de poder inferir si el cotransportador SGLT1 constituye un blanco para la unión de la molécula kanferol 3-*O*- α -ramnosido.

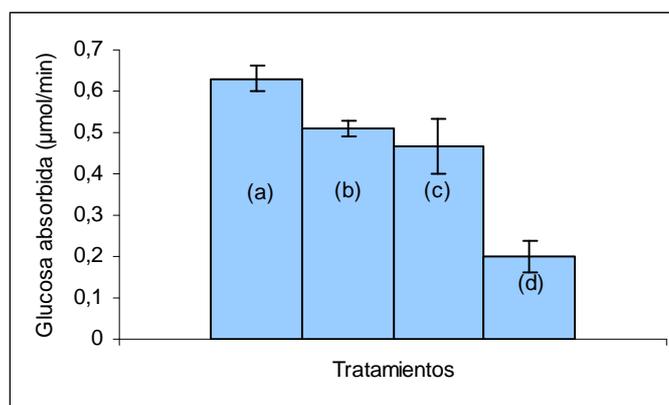


Figura 19. Efecto del kanferol 3-*O*- α -ramnosido en presencia de floricina, sobre la absorción intestinal de glucosa en ratas. En el animal anestesiado se aislaron 4 segmentos intestinales, *in situ*, luego en los cuales se inyectó por separado 1 mL de una solución acuosa que contenía NaCl al 0,9% y glucosa 10 mM: (a) control, (b) en adición kanferol 3-*O*- α -ramnosido 50 mM, (c) en adición de floricina 0,1 mM, (d) en adición de kanferol 3-*O*- α -ramnosido 50 mM + floricina 0,1 mM; luego de 30 min se determinó la cantidad de glucosa absorbida. Los resultados corresponden al promedio \pm D.E de 3 experimentos.

En la Figura 19, se muestra que la floricina y el kanferol 3-*O*- α -ramnosido condicionan una inhibición de la absorción intestinal de glucosa muy similar y de aproximadamente 25 %. Al inyectarse junto ambos compuestos se observó una inhibición de absorción intestinal de glucosa de aproximadamente 65 %, lo cual es más del doble del valor observado con cada compuesto por separado.

5. DISCUSION

Los resultados del estudio fitoquímico y biológico, demostraron que el flavonoide kanferol 3-*O*- α -ramnosido proveniente de la extracción de las hojas frescas de *B. megalandra* fue capaz de inhibir la absorción intestinal de glucosa.

Respecto al proceso de extracción, se siguió parte de la metodología descrita por Estrada y col (Estrada y col., 2005) ya que de acuerdo al esquema planteado ellos obtuvieron varios compuestos de tipo flavonoides entre los cuales destacan quercetina, kanferol y sus derivados. Esto en parte nos sirvió como guía para asegurar que las fracciones que se obtuvieron, contenían flavonoides. De las CCF realizadas a las distintas fracciones se determinó que los flavonoides presentes en las mismas eran compuestos polares ya que para observar su separación en la placa fue necesario utilizar solventes de polaridad mediana a alta. Por lo que obtuvimos que como características generales de estos flavonoides están: su solubilidad en solventes polares, carácter fenolico y la intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de grupos aromáticos conjugados.

Del bioensayo realizado a las tres fracciones FI₂, FI₃ y FS₃ se demostró que esta última presentó una mayor capacidad de inhibición sobre la absorción intestinal de glucosa (Figura 16) con aproximadamente un 43 % de inhibición, comparado con los valores obtenidos para FI₂, FI₃ que fueron 6,74 % y 9,54 % respectivamente. Así mismo en las CCF realizadas a FI₂, FI₃ y FS₃ se demostró que en FS₃ existía la mayor cantidad de compuestos tipo flavonoide. Por lo antes mencionado fue evidente que la fracción FS₃, abundante en flavonoides, contenía el compuesto responsable de la inhibición de absorción intestinal de glucosa, por lo que se procedió a su fraccionamiento por el método cromatográfico de contracorriente.

Para la separación cromatográfica por contracorriente se ensayaron distintas mezclas de solventes y se encontró que aquella constituida por cloroformo: metanol: agua (4: 3,5: 2) separó bien los compuestos presentes, pero la diferencia en los valores de R_f de los mismos era muy pequeña entre si, por lo que se probó disminuir la polaridad de la mezcla adicionando n-butanol, quedando formada por cloroformo: n-butanol: metanol: agua (4: 0,5: 3: 2). La polaridad de los solventes orgánicos utilizados fue una característica muy importante el cual determino el orden de elución de los distintos compuestos en la separación cromatográfica por contracorriente.

La realización de la CCF, con este sistema de solventes, mostró separar mejor los distintos compuestos. Una vez establecido el sistema de solvente a utilizar, se procedió a la preparación de la misma y a la separación de las dos fases formadas, la acuosa y la orgánica, la fase orgánica se tomó como fase móvil y la fase acuosa como fase estacionaria. En tal sistema, las fases inmiscibles, uno más pesado y otro más ligero, se mueven en distintas direcciones y se disponen de forma que una fase permanezca estacionaria y la otra pase a través de la columna, mediante bombeo, lográndose así la separación de los distintos compuestos.

En general, el resultado obtenido por este método cromatográfico por contracorriente resultó ser de gran eficiencia ya que el rendimiento del proceso fue de 78,57 %, comparado con otros métodos, por ejemplo cromatografía en columna en sílica, que se sabe, tienden a dar un bajo rendimiento respecto a la cantidad recuperada como productos.

De la cromatografía por contracorriente se obtuvo 90 fracciones, cada una de aproximadamente 5 mL y luego de dejar evaporar el solvente se les realizó CCF. Una vez hecho esto se observó bajo una lámpara de UV/visible a dos longitudes de onda, y se

reveló las placas en una cámara de yodo de manera de poder observar que fracciones contenían igual o iguales compuestos (manchas con igual Rf) para así poder unir las mismas (Tabla 1). A medida que se iba evaporando el solvente de las fracciones unidas se observó la formación de sólidos y principalmente en las fracciones F₃₈₋₅₀ y F₈₈₋₉₀ se obtuvo sólidos de coloración amarilla, indicativo de la presencia de flavonoides.

Las CCF realizadas a las fracciones F₃₈₋₅₀ y F₈₈₋₉₀ y su posterior revelado con sulfato cerico, mostraron una única mancha de coloración amarilla con diferente Rf, por lo cual se concluyó que corresponden a compuestos diferentes y que además estaban bastantes puras para hacerles su caracterización química por el método RMN-[¹H] y RMN-[¹³C].

Como resultado del análisis de los espectros de RMN [¹H] y [¹³C] se observaron señales características para dos tipos de flavonoides. Para la fracción F₃₈₋₅₀, se consiguió que las señales de los protones H-6 y H-8 estaban acopladas en *meta*, por lo que se deduce que los carbonos 5 y 7 del anillo A, se encuentran sustituidos por grupos hidroxilo. El desplazamiento de los protones H-2', H-6' (7,73 ppm) y H-3', H-5' (6,89 ppm) nos muestra que ambos son químicamente equivalentes, además los protones H-5' y H-6' y los protones H-2' y H-3' presentaron un acoplamiento *orto*, lo que sugirió la sustitución del carbono de la posición 4' del anillo B con un grupo hidroxilo (Espectro 1 y 2 de Anexos).

Por otro lado, ya que en el espectro de RMN [¹³C] (Espectro 3 de Anexos) se observa una señal característica de un carbono carbonílico conjugado (178,15 ppm) para la posición 4, y que existe la ausencia de señales para H-2 y H-3 podemos sugerir que este compuesto corresponde a una flavonol sustituida en la posición 3 como lo es el kanferol.

Así mismo los resultados de RMN [¹³C] expuestos para los carbonos del azúcar, fue posible observar señales que correspondían a un O-glucósido unido a la posición 3 del anillo A, por lo que se sugirió que el flavonol kanferol estaba glicosilado. Adicionalmente

el espectro de protones reveló una señal característica en la posición 6'' (0,77 ppm) correspondiente a un grupo metilo, el cual es característico para el azúcar ramnosa. En conclusión, se identificó el compuesto presente en F₃₈₋₅₀ como el flavonoide glicosilado kanferol 3-*O*- α -ramnosido.

En la fracción F₈₈₋₉₀ las señales observadas fueron similares a las de kanferol 3-*O*- α -ramnosido, tanto para el espectro de protones como para el de carbono, con la diferencia que para esta última existió la ausencia de la señal H-3' (Espectro 4 y 5 de Anexos), por lo que se sugirió que en la posición H-3' se encuentra sustituido un grupo hidroxilo, siendo esta la única diferencia con la estructura anterior por lo que el compuesto presente en F₈₈₋₉₀ se identificó como quercetina 3-*O*- α -ramnosido.

A los compuestos kanferol 3-*O*- α -ramnosido y quercetina 3-*O*- α -ramnosido se les evaluó el efecto sobre la absorción intestinal de glucosa junto con otro compuesto, kanferol 3-*O*- α -(2''-galoil) ramnosido, que se obtuvo a partir de *B. megalandra* por Estrada y col. (Estrada y col, 2005). En los resultados se aprecia que el kanferol 3-*O*- α -ramnosido, mostró la mayor actividad inhibitoria sobre la absorción intestinal de glucosa de los compuestos ensayados (Figura 18); se observó que en los segmentos intestinales controles se absorbió 0,30 μ mol/min de glucosa en comparación al valor de 0,21 μ mol/min absorbidos en presencia de 5 mM del flavonoide, lo cual representa aproximadamente el 28% de inhibición de la absorción intestinal de glucosa, de manera contraria ocurrió con los compuestos ensayados los cuales mostraron muy bajo efecto inhibitorio. En el mejor de nuestros conocimientos, es la primera vez que el kanferol 3-*O*- α -ramnosido es reportado como un inhibidor de la absorción intestinal de glucosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos es importante recalcar:

- ✓ A nivel de estructura química, la presencia de un grupo galoil unido a la ramnosa prácticamente anula el efecto inhibitorio del kanferol 3-*O*- α -ramnosido sobre la absorción intestinal de glucosa.
- ✓ Además de esto, es importante destacar que el azúcar ramnosa igualmente no es determinante sobre la inhibición ya que esta se encuentra en ambos compuestos kanferol 3-*O*- α -ramnosido y quercetina 3-*O*- α -ramnosido, y este último mostró similar efecto al exhibido por el kanferol 3-*O*- α -(2''-galoil) ramnosido.
- ✓ Aun de mayor importancia es hacer notar que la única diferencia entre los compuestos kanferol 3-*O*- α -ramnosido y quercetina 3-*O*- α -ramnosido es la sustitución en la posición 3' del anillo A de un H por OH (Figura 17), por lo cual podemos sugerir que esta sustitución es determinante para que se produzca la inhibición de la absorción intestinal de glucosa.

En la Tabla 2 se muestra los valores cinéticos (K_M y V_{MAX}) de la absorción intestinal de glucosa en ausencia y presencia del kanferol 3-*O*- α -ramnosido. Los valores obtenidos para el control son diferentes a los reportados por Li y col. (2005) y Ader y col. (2000), sin embargo es importante destacar que la metodología empleada por ellos en un caso se utilizó vesículas aisladas de borde apical y en el otro segmentos intestinales evertidos, y en ambos los parámetros cinéticos medidos corresponden al funcionamiento del SGLT1 y en nuestro caso corresponde a todo el proceso de absorción intestinal de glucosa.

El kanferol 3-*O*- α -ramnosido modificó los parámetros cinéticos de la absorción intestinal de glucosa (Tabla 2) elevando el K_M de una manera estadísticamente significativa ($p < 0,005$), respecto al control, y sin una modificación importante de la V_{MAX} ($p < 0,5$), por lo cual sugerimos que se comporta como un inhibidor competitivo. Vale la pena

mencionar que Li y col (2005) reportaron que la flavanona naringenina también se comportó como un inhibidor competitivo del SGLT.

Al evaluar el efecto del kanferol 3-*O*- α -ramnosido en presencia de un inhibidor conocido del cotransportador SGLT1 como lo es la floricina (Panayatova-Heiermann y col, 1995) observamos que ambos compuestos, por separado, condicionan una inhibición de la absorción intestinal de glucosa muy similar de aproximadamente 25 %. Al inyectarse en los segmentos intestinales conjuntamente ambos compuestos se observó una inhibición de absorción intestinal de glucosa de aproximadamente 65 % (Figura 19), lo cual es más del doble del valor observado con cada compuesto por separado. Estos resultados nos muestran una clara evidencia de un efecto sinérgico entre el kanferol 3-*O*- α -ramnosido y la floricina por lo cual sugerimos que este flavonol glicosilado inhibe competitivamente al cotransportador SGLT1.

6. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos y analizados, podemos concluir que:

- ✓ Del estudio fitoquímico y biológico realizado, a partir de las hojas frescas de *B. megalandra*, se aisló y purificó el compuesto kanferol 3-*O*- α -ramnosido y se demostró que tiene un efecto inhibitorio sobre la absorción intestinal de glucosa.

- ✓ La diferencia en la sustitución de un grupo hidroxilo en la posición H-3', kanferol 3-*O*- α -ramnosido vs quercetina 3-*O*- α -ramnosido es determinante sobre la inhibición de absorción intestinal de glucosa.

- ✓ De la realización de la curva de saturación de la glucosa, se determinó la cinética de del compuesto aislado, revelando que el efecto inhibitorio es de tipo competitiva.

- ✓ El efecto aditivo generado al colocar kanferol 3-*O*- α -ramnosido conjuntamente con floricina, dan indicio de un sinergismo por lo que posiblemente el kanferol 3-*O*- α -ramnosido actúa como blanco inhibiendo al cotransportador SGLT1.

7. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar ensayos biológicos usando vesículas de borde apical con la finalidad de comprobar el efecto del kanferol 3-*O*- α -ramnosido sobre SGLT1.

- ✓ Determinar el IC₅₀ del kanferol 3-*O*- α -ramnosido sobre la absorción intestinal de glucosa.

- ✓ Estudiar el efecto del kanferol 3-*O*- α -ramnosido sobre la curva oral tolerancia glucosada.

- ✓ Continuar con la separación de alguna de las fracciones no estudiadas, para evaluar algunos otros compuestos en las hojas de *B. megalandra* que pueda inhibir la absorción intestinal de glucosa.

8. REFERENCIAS

Ader, P.; Blöck, M.; Pietzsch, S.; Wolffram, S. 2001. Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Letters*, **162**:175-180.

Aoshima, H.; Yokoyama, T.; Tanikazi, J.; Izu, H. 1997. The Sugar Specificity of a Na⁺/Glucose Cotransporter from Rat Jejunum. *Bioscience, Biotechec and Biochem.* **61**: 979-983.

Aristiguieta, L. 1962. Árboles ornamentales de Caracas. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. 2002. Biochemistry. W.H. Freeman and Co. New York, US. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. [Consulta: 20 enero 2009]

Daubront, V. Y.; Gonzalez Mujica, F.; Motta, N.; Rodriguez, M.; Hasegawa, M. 2009. Purificación parcial de un compuesto presente de las hojas de *Bauhinia megalandra* capaz de inhibir la absorción intestinal de glucosa. *Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica. En prensa.*

Dean, L & Mc Entyre, J.R. 2004. The Genetic Landscape of Diabetes. National Library of Medicine, US. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. [Consulta: 12 diciembre 2008]

Estrada, O.; Hasegawa, M.; González-Mujica, F.; Motta, N.; Perdomo, E.; Solorzano, A.; Méndez, J.; Méndez, B.; Zea, G. 2005. Evaluation of flavonoids from *Bauhinia megalandra* leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. *Phytotherapy Research* **19**: 859-863.

González-Mujica, F.; Motta, N.; Estrada, O.; Perdomo, E.; Méndez, J.; Hasegawa, M. 2005. Inhibition of Hepatic Neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O-

α -(2''-galloyl) rhamnoside isolated from *Bauhinia megalandra* leaves. *Phytotherapy Research* **19**: 624-627.

Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Márquez, A.H.; Capote-Zulueta, J. 2003. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. *Fitoterapia*. **74**: 84-90.

González-Mujica F.; Motta, N.; Becerra A. 1998. Inhibition of Hepatic Neoglucogenesis and Glucose-6-Phosphatase by Aqueous Extract of *Bauhinia megalandra* leaves. *Phytotherapy Research*. **12**: 1-3.

Hokche O. 2007. El genero *Bauhinia* L. Herbario Nacional de Venezuela. **1**: 178-182.

Hoyos, J. 1978. Flora Tropical Ornamental. Sociedad de flora tropical La Salle. Monografía N° 24. Caracas, Venezuela.

Johnson, A; Lewis, R; Roberts, W. 2002. Molecular Biology of The Cell. 4th Edition, Garland Science, USA.

Leather, B., R.J. 1987. Enzfitter. *Elsevier Science Publisher B.V.* Amsterdam.

Lemus, I.; [García, R.](#); [Delvillar, E.](#); [Knop, G.](#) 1999. Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research*. **13**:91-94

Li, J. M.; Che, C.T; Lau, C.B.S.; Leung, P.S.; Cheng, C.H.K. 2005. Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenin. *Biochemistry & Cell Biology*. **38**: 985-995.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J.E. 2000. Molecular Cell Biology. W.H. Freeman & Co. New York, USA.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. [Consulta: 15 diciembre 2008]

Marcano, D.; Hasegawa, M. 1991. Fitoquímica Orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela.

Middleton, E. Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacolical Review.* **52**:673-751.

Nussey, S.S. y Whitehead, S.A. 2001. Endocrinology: An Integrated Approach. BIOS Scientific Publishers, Ltd. Oxford, UK. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. [Consulta: 12 diciembre 2009]

Panayatova-Heiermann, M.; Loo, D.D.F.; Wright, E.M. 1995. Kinetics of Steady-state Currents and Charge Movements Associated with the Rat Na⁺/Glucose Cotransporter. *Biological Chemistry.* **270**: 27099-27105.

Pepato, M.T; Keller, E.H; Baviera, A.M; Kelfelhut, I.C; Vendramini, R.C; Brunetti I.L. 2002. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. *Ethnopharmacology.* **81**: 191-197.

Silva, F.R.; Szpoganicz, B.; Pizzolatti, M.G.; Willrich, M.A.; Sousa, E. 2002. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Ethnopharmacology.* **83**:33-37.

Singab, A.N; El-Beshbishy, H.; Yonekawa, M.; Nomura, T.; Fukai, T. 2005. Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: Effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ethnopharmacology.* www.sciencedirect.com

Sperelakis, N. 2001. Cell Physiology Sourcebook. 3rd Edition, Academic Press, USA.

Tresquerres, J.A.F. 1999. Fisiología Humana. 2^{da} Edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España.

Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Clinical Pathology.* **22**(2):246.

Xiaoyan, Z.; Maud U.; Mona P.; Geoffrey G.C.; Roxanne E.Z.; Haiyan B.; Bruce R.; y col. 2006. Indole glucosides as novel sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors. Part 2. *Bio & Med Chem Letters*. www.sciencedirect.com.

Zhang, X.; Urbanski, M.; Patel, M.; Zeck, R.E.; Cox, G.G.; Bian, H.; Conway, B.R. Beavers, M. P.; Rybczynski, P.J.; Demarest, K.T. 2005. Heteroaryl-*O*-glucosides as novel sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. Part 1. *Bio & Med Chem Letters* 15:5202–5206.

Consultas en línea:

http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/

Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2004. Anuario de Mortalidad 2003. Caracas, Venezuela. <http://www.msds.gov.ve>. [Consulta: 8 diciembre 2008].

ANEXOS

