

Aislamiento, Identificación y Cuantificación de Compuestos con Actividad Gastroprotectora presentes en *Centaurea solstitialis*.

Toso, R. E.¹ y Skliar, M. I.¹

¹Cátedra de Farmacognosia, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, San Juan 670, (8000) Bahía Blanca, retoso@criba.edu.ar

RESUMEN

Centaurea solstitialis es una planta con propiedades antiulcerosas. Teniendo como objetivo lograr el aislamiento, identificación y cuantificación de compuestos bioactivos responsables de la actividad gastroprotectora, se llevaron a cabo estudios fitoquímicos bioguiados en busca de flavonoides relacionados con esta actividad farmacológica. Una fracción metanólica obtenida a partir de capítulos desecados de la planta, fue extraída con acetato de etilo previa hidrólisis con ácido clorhídrico. La fracción acetato de etilo fue cromatografiada en capa delgada sobre placas de sílica gel y las bandas, que comigraron con estándares auténticos de quercetina ($R_f = 0,80$) y canferol ($R_f = 0,89$), se purificaron por HPLC, obteniéndose el aislamiento de los dos flavonoides. Los compuestos fueron recuperados e identificados por espectrometría de masas. Ensayos cuantitativos permitieron determinar que los capítulos de la planta contienen 0,63 y 1,47 mg de quercetina y canferol por gramo de materia seca respectivamente.

SUMMARY

Centaurea solstitialis is a plant with antiulcerous properties. To isolate and identify bioactive compounds responsible for the gastroprotective activity, phytochemistry bioguided studies were carried out in flavonoids related with this pharmacological activity. A methanolic fraction, obtained from dried heads of the plant, was extracted with ethyl acetate previous hydrolysis with hydrochloric acid. Ethyl acetate fraction was chromatographed in thin layer on plates of silica gel and the bands, that comigrated with authentic standards of quercetin ($R_f = 0.80$) and kaempferol ($R_f = 0.89$), became purified by HPLC, getting the isolating of the two flavonoids. The compounds were recovered and identified by mass spectrometry. Quantitative essays allowed to determine that the heads of the plant contain 0.63 and 1.47 mg of quercetin and kaempferol per gram of dry matter respectively.

INTRODUCCIÓN

En trabajos previos se informó la actividad antiulcerosa de la *Centaurea solstitialis* que se desarrolla en el Departamento Maracó de la Provincia de La Pampa, Argentina, utilizando un modelo de estrés en ratas (Toso y Skliar, 1999). Posteriores investigaciones, utilizando indometacina como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (Toso y Skliar, 2000a), confirmaron que la actividad antiulcerosa exhibida por extractos metanólicos obtenidos de la planta se explicaba, al menos en parte, por una acción citoprotectora y por un efecto antiespasmódico (Toso y Skliar, 2000b). Estos trabajos y el esquema de extracción utilizado orientaron los estudios fitoquímicos hacia la búsqueda de compuestos solubles en metanol y con las mencionadas propiedades farmacológicas.

Los flavonoides son difenilpropanos con esqueletos de 15 C que provienen biogenéticamente de tres unidades de acetato (C6) y una unidad de fenilpropano (C6-

C3). El anillo B, proveniente de la condensación de las unidades acetato, está unido al C α de la unidad fenilpropano formando así los flavonoides propiamente dichos o flavanos. Estos polifenólicos, son fenilbenzopironas de bajo peso molecular derivados de la unión de tres anillos A, B y C, dos de ellos aromáticos. Presentan una gran variedad de estructuras básicas que dan lugar a una serie de compuestos que difieren en su grado de oxidación y sustituyentes (Fig. 1).

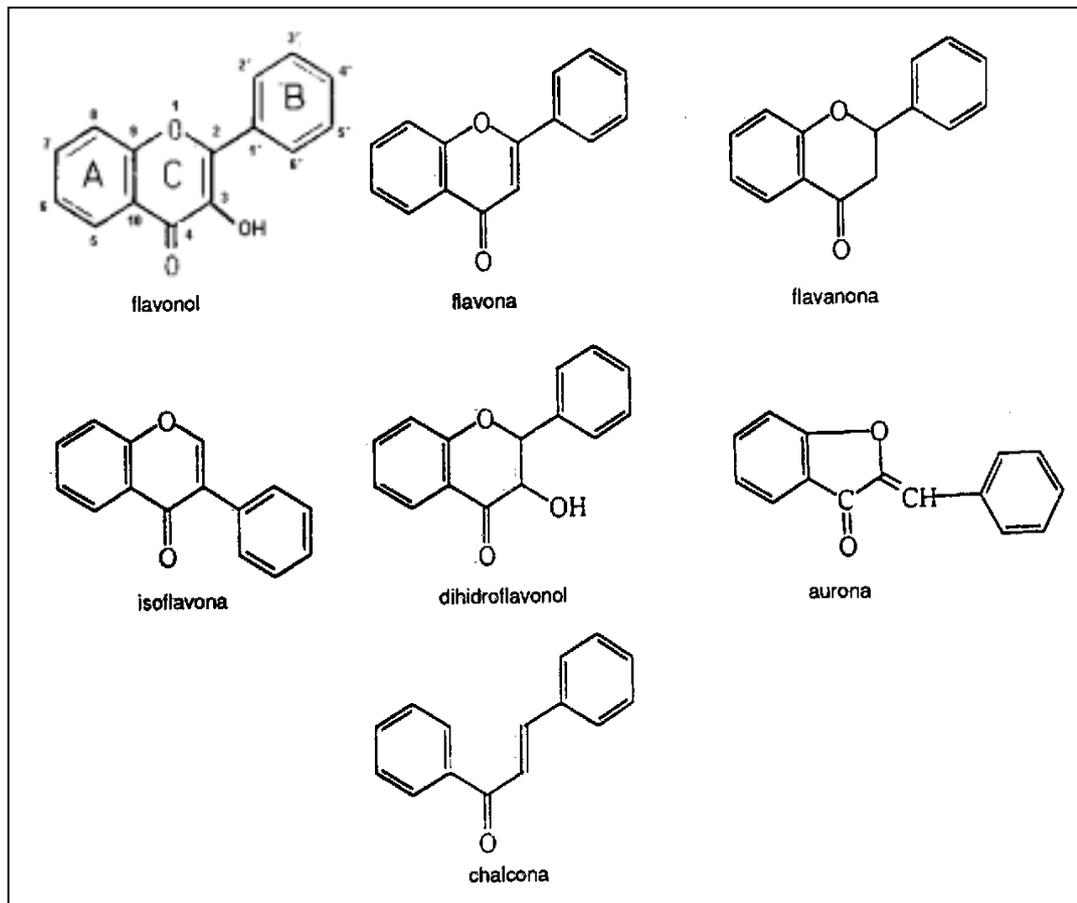


Fig. 1: Principales estructuras básicas de los flavonoides.

Las flavonas y los flavonoles son poco solubles en agua, mientras que los dihidroflavonoles son muy solubles. Todos los flavonoides son muy solubles en metanol. Estos compuestos incluyen sustancias coloreadas como las antocianinas, presentes en gran cantidad en frutos, flores y brácteas donde dan colores azules, violetas y rojos. Las chalconas tienen color anaranjado, los flavonoles y flavonas amarillo y las leucoantocianidinas son incoloras. Considerando la acción farmacológica de los flavonoides, los más importantes son aquellos que derivan del difenil-1,3-propano ó 2-fenil-benzopirano pues poseen un grupo carbonilo en C4, como por ejemplo las flavonas (Gros et al., 1985). Estos compuestos se encuentran generalmente unidos a azúcares en forma de glicósidos.

Los flavonoles son importantes constituyentes de la dieta humana, son de baja toxicidad y presentan numerosas actividades biológicas entre las que podemos mencionar efectos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, mutagénicos demostrados in vitro, antiagregante plaquetario, antiespasmódico, inmunomodulador, hepatoprotector y ansiolítico. Recientemente han sido investigados por sus efectos antiproliferativos, antioxidantes y antiinflamatorios (Martino, 2000).

Algunos flavonoides previenen la formación de úlceras en modelos experimentales, entre ellos el canferol y la quercetina (Fig. 2).

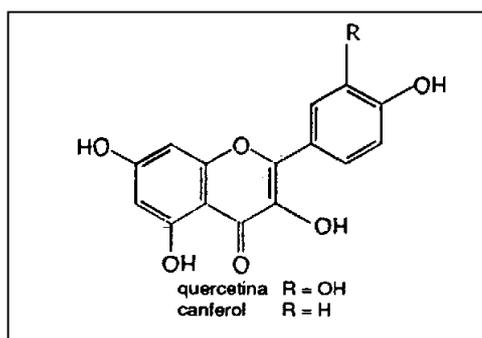


Fig. 2: Estructura química de quercetina y canferol.

El canferol, cuando es administrado intraperitonealmente, posee efecto protector dosis-dependiente en ratas, previniendo la formación de úlceras gástricas inducidas por etanol o por inmovilización y frío en estos animales. Estudios sobre la liberación de eicosanoides en mucosa gástrica y colónica humana incubada, demuestran que el canferol aumenta la liberación de prostaglandinas por parte de la mucosa gástrica, mientras que en altas dosis inhibe prostanoïdes y leucotrienos C₄ liberados por ambas mucosas, gástrica y colónica. El efecto antiulcerogénico puede explicarse a través del papel de las prostaglandinas en los mecanismos de citoprotección. El posible mecanismo incluye inhibición de la secreción de ácido gástrico, estimulación de la secreción de bicarbonato, reducción de la exfoliación celular e incremento del flujo sanguíneo mucosal (Goel et al., 1996). Todas estas acciones contribuyen a preservar la barrera mucosa gástrica.

La quercetina es otro flavonoide que posee efecto antioxidante y actividad miolítica sobre la musculatura lisa gastrointestinal. La motilidad del estómago y su relación con la formación de úlceras gástricas ha sido motivo de estudio desde hace muchos años. Experiencias utilizando estimulación eléctrica vagal y drogas como la pilocarpina, evidenciaron que la contracción de la mucosa producía trastornos circulatorios que desencadenaban desde erosiones de la mucosa de distinta intensidad hasta úlceras y perforaciones en conejos, gatos, perros y cobayos (Ivy et al., 1954). Durante estos estudios se desconocía aún gran parte de la acción del sistema nervioso central y entérico sobre la actividad gástrica y el papel de la barrera mucosa gástrica. Sin embargo, estas experiencias pusieron en evidencia la importancia de la motilidad gástrica y su relación con la génesis de las lesiones de la mucosa. Otros autores estudiaron la citoprotección de una droga preparada a partir de tres plantas sobre la relajación de la musculatura gástrica en ratas, encontrando que la motilidad gástrica juega un importante papel en la gastroprotección inducida por etanol (Lin y Tan, 1994).

Diferentes flavonoides han sido mencionados por sus efectos miolíticos sobre las contracciones espontáneas o provocadas por estímulos eléctricos y drogas agonistas del íleon aislado. Hammad y Abdalla (1997) mostraron los efectos inhibitorios sobre la motilidad en íleon aislado de rata de once flavonoides, determinando el siguiente orden de potencia de mayor a menor: galangina, quercetina, crisina, xantomicrol, flavona, naringenina, fisetina, morina y flavonona. Los flavonoides rutina y 3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-7-rutosido no presentaron actividad significativa, concluyendo que la quercetina posee una importante acción miolítica en relación a los otros flavonoides y que aquellos compuestos que se encuentran conjugados con azúcares en su estructura no poseen actividad importante sobre la motilidad. Las conclusiones de estos autores respecto a la rutina no coinciden con los resultados encontrados en experimentos in vivo en ratones por Di Carlo et al. (1993) quienes determinaron que este compuesto tiene efecto inhibitorio sobre la motilidad intestinal. Estos autores ensayaron, además, otros flavonoides tales como apigenina, flavona, canferol, morina, miricetina y naringenina,

los cuales exhibieron un importante efecto inhibitorio cuando se administraron intraperitonealmente en dosis de 12,5 a 50 mg/kg en ratones. Otros compuestos tales como la silibina, naringenina y taxifolina necesitaron dosis intraperitoneales de 100 a 200 mg/kg de peso para producir una moderada acción inhibitoria sobre el tránsito intestinal. Es probable que las similitudes estructurales entre estos compuestos estén relacionadas con su actividad sobre la motilidad gastrointestinal y que la diferencia entre sus acciones se deba a la presencia o ausencia de determinados grupos químicos. El o los mecanismos de acción de estos compuestos estarían influenciados por la estructura de sus moléculas y mediados por receptores α_2 -adrenérgicos y calcio.

Distintas investigaciones han sido orientadas a elucidar el mecanismo de acción que actúa inhibiendo la musculatura lisa del tracto gastrointestinal. Algunos autores han concluido que este mecanismo está relacionado con el incremento de los niveles de nucleótidos cíclicos inducidos por la fosfodiesterasa, enzima inhibida por estos flavonoides (Beretz et al., 1980; Petkov et al., 1983). Otros estudios indican que su mecanismo de acción estaría relacionado con la movilización del calcio (Morales y Lozoya, 1994).

Estudios realizados administrando indometacina y rutina a ratas a las cuales se les indujo daño gástrico con etanol, determinaron que las prostaglandinas no están involucradas en el efecto gastroprotector observado (Pérez Guerrero et al., 1994).

La miricetina conjugada protegió el daño de la mucosa gástrica de ratones sometidos a estrés por frío e inmovilización y por etanol, sin que se produzca un aumento de proteínas y hexosaminas. Estos resultados, llevados a cabo en ratas, sugieren que el mecanismo de acción de la miricetina no está relacionado con cambios secretorios que aumenten el contenido de glicoproteínas contenidas en el mucus gástrico (Reyes et al., 1996).

Teniendo en cuenta estas referencias, en el presente trabajo se investigó la posible presencia de apigenina, rutina, canferol y quercetina en *Centaurea solstitialis*. Los compuestos identificados fueron cuantificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los capítulos de *Centaurea solstitialis* (n.v. Abrepuño; Cs), (Asteraceae), fueron colectados en el Departamento Maracó (Provincia de La Pampa), entre los meses de enero y febrero de 2000. La planta fue autenticada por el Dr. Carlos Villamil del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS), Bahía Blanca. Un ejemplar ha sido depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía (UNLPam), Santa Rosa (R. Toso 1, SRFA).

Materiales

Para el aislamiento se utilizaron solventes de alta calidad (HPLC), (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.). Los cromatofolios fueron provistos por Whatman Inc. (Clifton, NJ, EE.UU.). Los cartuchos LiChroCART y los guardacolumnas LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) para los análisis por HPLC fueron provistos por Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los estándares auténticos de apigenina, rutina, canferol y quercetina fueron provistos por Sigma (St. Louis, EE.UU.).

Extracción

Se mantuvo en ebullición 20 g de capítulos secos de Cs con 200 ml de agua destilada durante 20 minutos (2x). Los extractos se redujeron a presión reducida hasta consistencia butirosa obteniéndose un rendimiento de 36,74 % de extracto acuoso seco.

El residuo fue resuspendido con metanol (3 x 10 ml). Los extractos fueron llevados a sequedad a presión reducida obteniéndose un rendimiento de 15,95 % de extracto metanólico seco. Este extracto fue resuspendido con 10 ml de agua destilada y 25 ml de HCl 2 N y colocado en baño maría durante 20 minutos para hidrolizar los glicósidos de los flavonoides. La fracción fue colectada, filtrada y extraída con 10 ml de acetato de etilo (3x). La fracción acetato de etilo fue llevada a sequedad en rotavapor dando un rendimiento de 0,44 %. Los distintos extractos dieron resultados positivos a las reacciones de caracterización de Shinoda (Shinoda, 1928) y cloruro férrico (Geissman, 1962), revelando la presencia de grupos fenólicos característicos de los flavonoides. Esta fracción fue utilizada para sembrar en placas de capa fina, las bandas correspondientes a Rfs iguales a 0,80 y 0,89 fueron recuperadas, eluidas con metanol y evaporadas bajo corriente de nitrógeno. Cada fracción fue resuelta por HPLC y luego identificada por espectrometría de masas. Una alícuota del extracto metanólico seco fue resuspendido con metanol y cromatografiado en capa fina junto a estándares auténticos de canferol, quercetina, apigenina y rutina.

Cromatografía en capa fina (CCF)

La fracción acetato de etilo fue concentrada en rotavapor y se aplicó en forma de banda sobre placas de sílica gel 60 A° K6F de 250 µm de espesor (5 x 20 cm). El cromatograma se desarrolló utilizando un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo-metanol (100:10, v/v). Las bandas con similares Rfs a los estándares auténticos de quercetina y canferol fueron recuperadas, eluidas con 1 ml de metanol (3 x) y evaporadas bajo una corriente de nitrógeno. Una alícuota de extracto metanólico seco resuspendido con metanol se cromatografió utilizando placas de sílica gel 60 A° K6F de 250 µm de espesor (5 x 10 cm) en forma conjunta con estándares auténticos de quercetina, canferol, rutina y apigenina. Se desarrollaron dos cromatogramas diferentes utilizando como sistema de solvente acetato de etilo-metanol (10:1, v/v) para uno de ellos y para el otro tolueno-cloroformo-acetona (40:25:35, v/v/v).

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Cada fracción fue resuelta por HPLC con un equipo Isco Model 2360 de gradiente programable, equipado con un detector Model Isco V⁴ de longitud de onda multivariable y una bomba Isco Model 2350 (Isco, Lincoln, EE.UU.). Se utilizó un cartucho de fase reversa LiChroCART (4 x 250 mm) con guarda columna fase reversa LiChrospher 100 RP-18. Ambos compuestos fueron eluidos con 15-100 % metanol en agua durante 35 minutos.

Cuantificación de quercetina y canferol en capítulos de *Centaurea solstitialis*

Obtención del extracto metanólico

Se utilizaron 10 g de capítulos secos de Cs los cuales fueron extraídos en un soxhlet durante 6 h utilizando como solvente de extracción 300 ml de metanol. El extracto fue llevado a sequedad a presión reducida en rotavapor obteniéndose un rendimiento de 16,25 % de residuo metanólico seco.

Obtención de la fracción acetato de etilo

El residuo metanólico se resuspende con 50 ml de agua destilada y se agregan 50 ml de HCl 2 N. Luego de mantener en ebullición en baño maría durante 1 h se deja enfriar y se extrae con 50 ml de acetato de etilo (3x). Los extractos se juntan y filtran con papel de filtro y se llevan a sequedad en rotavapor obteniéndose un rendimiento de 2,8 %.

Cromatografía en capa fina

Se diluyen 70 mg del extracto acetato de etilo en 1 ml de metanol. Se siembran 25 μ l en placas de sílica gel G 60 F₂₅₄ Merck de 5 x 10 cm. Las placas fueron desarrolladas en acetato de etilo-metanol (10:1, v/v). Luego de secadas al aire se observaron bajo luz UV a 366 nm, las bandas con similares Rfs a los estándares auténticos de canferol y quercetina, fueron removidas y eluidas con metanol colocando el solvente de extracción en tubos de ensayo. Los extractos de cada fracción fueron evaporados bajo una corriente de nitrógeno.

Cromatografía líquida de alta eficacia

Cada fracción fue resuelta por HPLC en las mismas condiciones que las detalladas para la purificación de los compuestos.

Espectrometría de Masas

Los compuestos obtenidos por HPLC fueron identificados por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas magnético Micromass Model Autospec y un impacto electrónico de 70 eV (Micromass, Reino Unido).

RESULTADOS

Durante los procedimientos de extracción los extractos acuoso, metanólico y la fracción acetato de etilo dieron positivos las reacciones de caracterización que revelaron la presencia de grupos fenólicos característicos de los flavonoides. Los cromatogramas, obtenidos de la CCF con la fracción metanólica, no presentaron bandas que comigraran con los estándares auténticos de canferol, quercetina, rutina y apigenina en ninguno de los dos sistemas de solventes utilizados. De la fracción acetato de etilo se resolvieron dos bandas de Rfs 0,80 y 0,89 similares a las de los estándares auténticos de quercetina y canferol respectivamente.

Los compuestos fueron recuperados con metanol y purificados en HPLC revelando la presencia de dos picos con tiempos de elución similares a aquellos de los estándares auténticos de quercetina (29,42 minutos) y canferol (33,12 minutos) (Fig. 3).

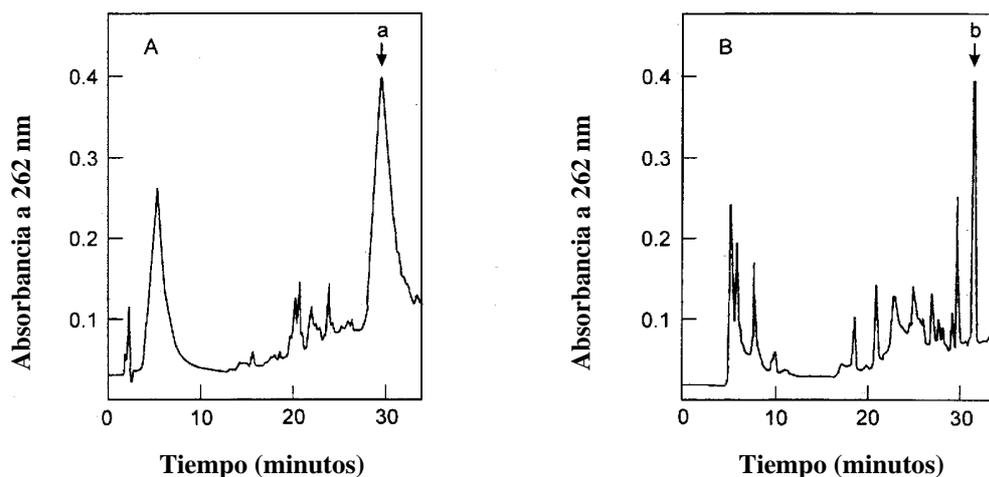


Fig. 3: Aislamiento de quercetina y canferol provenientes de capítulos de *Centaurea solstitialis* por HPLC. A los extractos de la fracción acetato de etilo se los cromatografió en capa fina como se indicó en Materiales y Métodos. Cada fracción de CCF fue posteriormente resuelta por HPLC usando un cartucho de fase reversa LiChroCART (4 x 250 mm). (A) quercetina y (B) canferol, eluidas con un gradiente de metanol – agua (15:85 a 100:0) en 35 minutos, $\lambda = 262$ y flujo 1ml/min. Las flechas indican la elución de muestras auténticas de (a) quercetina y (b) canferol.

La espectrometría de masas de los probables picos de quercetina y canferol provenientes de HPLC, se llevó a cabo con el objeto de elucidar sus estructuras químicas (Fig.4 A,B y 5 A,B).

En la figura 4 A se muestra el espectro de masas por impacto electrónico del pico de HPLC con un ion molecular (M^+) a m/z 302. La supuesta molécula de quercetina produce una señal intensa de masa 302 y otra más débil de masa 303 ($M^+ + 1$), debido a la tendencia a la protonación que poseen este tipo de compuestos (Seibl, 1973). La pérdida de un radical oxhidrilo del ion $M^+ + 1$ luego de la apertura de la molécula por ruptura entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, da un pico a m/z 286. A partir de éste, se origina el pico a m/z 257 por pérdida de CHO. El pico a m/z 229 fue causado por la pérdida de CO del pico a m/z 257. De este último pico formado, se obtiene una señal a m/z 128 por pérdida de 101 unidades de masa. La pérdida de 150 unidades de masa a partir del pico a m/z 303 dio como resultado el pico a m/z 153. La señal a m/z 273 resultó de la ruptura del ion molecular entre los carbonos 2 y 3 y posterior pérdida de CHO. El pico a m/z 245 se originó por la pérdida de CO a partir del pico con m/z 273 y el pico a m/z 142 se obtuvo por pérdida de 4 moléculas de agua y de CH_3O del pico a m/z 245. La pérdida de 165 unidades de masa del ion molecular, debido a la ruptura del mismo entre los carbonos 2-3 y las posiciones 1-9 del anillo C, produjo el pico a m/z 137. De esa señal de masa 137 por pérdida de O y de CO se obtuvieron los picos a m/z 121 y 109 respectivamente. En la figura 4 B se muestra un esquema de la formación de los distintos picos a partir del ion molecular.

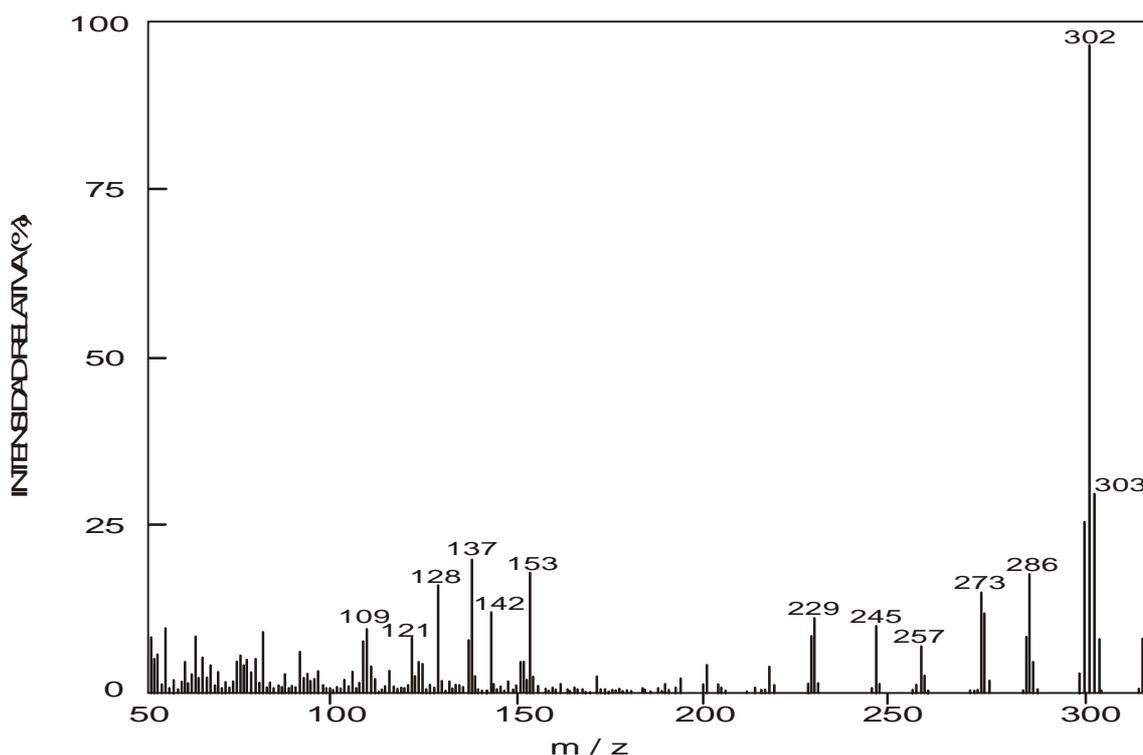


Fig. 4 A: Espectro de masas de la fracción de HPLC que contenía quercetina.

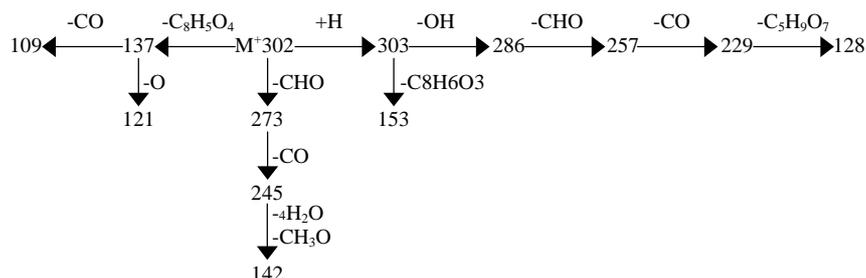


Fig. 4 B: Esquema indicando la formación de los picos a partir del ion molecular.

La figura 5 A muestra el espectro de masas por impacto electrónico del pico proveniente de HPLC cuyo ion molecular es m/z 286. Por lo dicho anteriormente, este tipo de moléculas tiene tendencia a la protonación y además a la dehidrogenación a partir del ion molecular, otra de las características de estos compuestos (Seibl, 1973). Debido a ello, se aprecian los picos a m/z 287 ($M^+ + 1$) y 285 ($M^+ - 1$) con señales más débiles que el M^+ . La ruptura de la molécula de $M^+ - 1$ entre los carbonos 2 y 3 del anillo C y la pérdida de 4 moléculas de agua da el pico a m/z 213 y de éste, por pérdida de CHO, se obtiene la señal a m/z 184. La pérdida de C_3H_3O da como resultado el pico a m/z 129. El pico a m/z 121 resulta de la ruptura del ion molecular entre los carbonos 2-3 y 1-9 del anillo C lo que produce una pérdida de 165 unidades de masa. El pico a m/z 257 se obtiene por pérdida de CHO del ion molecular previa ruptura del mismo entre los carbonos 2 y 3. La pérdida de CO de la señal a m/z 257 origina el pico a m/z 229. La pérdida de OH y CHO del pico a m/z 287, que sufrió la apertura del anillo por ruptura entre los carbonos 2 y 3, originó el pico a m/z 241. De éste, por pérdida de 4 moléculas de agua y C_2H_2 se obtiene el pico a m/z 143. La ruptura entre los carbonos 2 y 3 de la molécula del ion a m/z 287 y posterior pérdida de CHO da el pico a m/z 258. La señal a m/z 153 se produce por ruptura del $M^+ + 1$ entre las posiciones 1-2 y los carbonos 3-4 del anillo C, lo que provoca una pérdida de 134 unidades de masa. A su vez, el pico a m/z 136 es originado por la pérdida de OH a partir de la señal a m/z 153, mientras que el m/z 93 se forma por pérdida de CH_3CO del pico a m/z 136. La misma señal a m/z 153 produce el pico a m/z 108 por pérdida de CO y OH, mientras que de este último se origina el pico a m/z 77 por pérdida de 31 unidades de masa. En la figura 5 B se muestra un esquema de la formación de los distintos picos a partir del ion molecular.

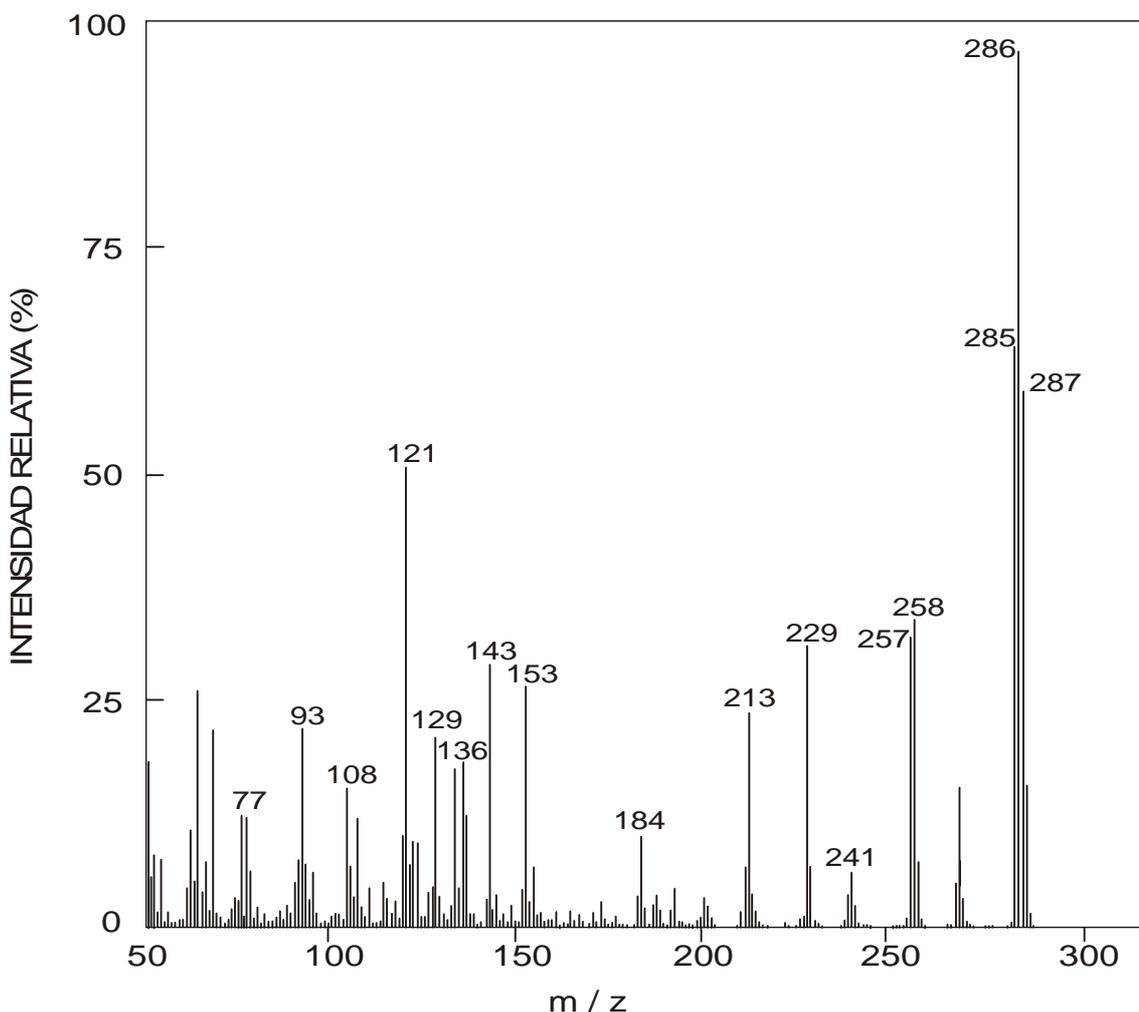


Fig. 5 A: Espectro de masas de la fracción de HPLC que contenía canferol.

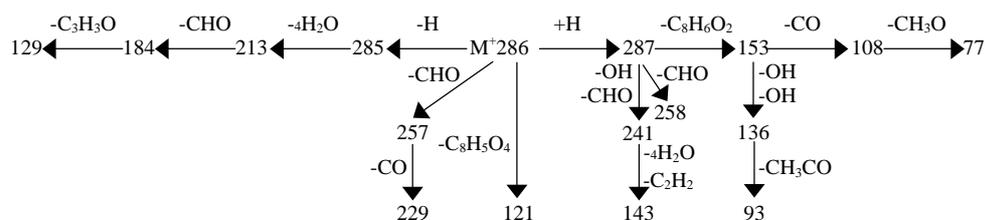


Fig. 5 B: Esquema indicando la formación de los picos a partir del ion molecular.

Para cuantificar quercetina y canferol en capítulos secos de *Centaurea solstitialis* se tuvo en cuenta el resultado negativo en la búsqueda de rutina en la fracción metanólica, que condujo a utilizar el método de extracción basado en la hidrólisis por ácido clorhídrico. Si las fracciones poseen rutina, ésta debe aislarse antes de hidrolizar la fracción, ya que la hidrólisis de la rutina da quercetina.

Por medio de HPLC y utilizando estándares sintéticos se elaboraron curvas de calibrado de distintas concentraciones de quercetina y canferol. Se aislaron ambos flavonoides partiendo de 10 g de capítulos de *Centaurea solstitialis* por los métodos de aislamiento detallados en Materiales y Métodos. Los cálculos correspondientes determinaron que los capítulos de Cs contienen 0,63 mg de quercetina por gramo de materia seca y 1,47 mg de canferol por gramo de materia seca.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se orientó la búsqueda de compuestos activos a través de resultados obtenidos en ensayos bioguiados realizados previamente por los autores. En estos trabajos se determinó que la acción antiulcerosa, exhibida por los extractos metanólicos de *Centaurea solstitialis*, estaba mediada por mecanismos citoprotectores y una disminución de la motilidad gástrica. Evidencias tales como la solubilidad en metanol de los flavonoides, la caracterización de éstos en el extracto metanólico y la presencia de compuestos con propiedades citoprotectora y espasmolítica en este grupo, permitieron investigar la posible presencia de apigenina, rutina, canferol y quercetina.

Di Carlo et al. (1993), demostraron que la rutina, quercetina y apigenina, retrasan el tránsito intestinal, considerando que estos compuestos actuarían de la misma forma sobre la musculatura lisa gástrica se investigó su posible presencia en el extracto metanólico de *Centaurea solstitialis*. Además, se analizó la probable presencia de canferol, compuesto con reconocida acción citoprotectora y miolítica.

El aislamiento por HPLC e identificación por espectrometría de masas de canferol en la fracción metanólica (Fig. 3 B y 5 A respectivamente), permitieron confirmar la presencia de este compuesto y realizar estudios cuantitativos que detectaron 1,47 mg de canferol por gramo de materia seca.

Para el aislamiento de canferol y quercetina a partir de la fracción acetato de etilo, como se describe en Materiales y Métodos, se realizó una hidrólisis de la fracción metanólica con ácido clorhídrico para separar los glicósidos. Este procedimiento permitió el aislamiento de canferol y quercetina libres. La presencia de rutina se investigó antes del agregado del ácido clorhídrico a la fracción metanólica, ya que la hidrólisis de este flavonoide da quercetina (Fig. 6).

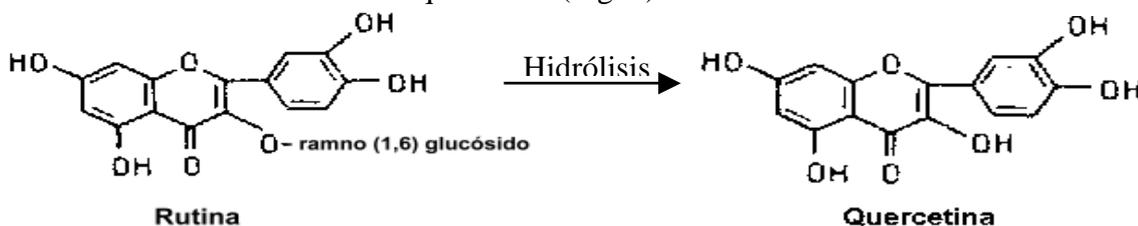


Fig. 6: Reacción de formación de quercetina a partir de la hidrólisis de rutina.

La presencia de rutina en el esquema de extracción utilizado, determinaría un aumento en la concentración de quercetina y en consecuencia, el valor detectado de este flavonoide no sería real, ya que estaría enmascarado por una mayor cantidad del compuesto proveniente de la hidrólisis de la rutina. Por lo tanto, se realizó una extracción con acetato de etilo de la fracción metanólica y se cromatografió en capa fina con resultados negativos. En forma simultánea, se cromatografió la fracción metanólica con estándares auténticos de quercetina y canferol para determinar la presencia de estos compuestos en forma libre con resultados negativos. Esto fue lo esperado, ya que, en general, los flavonoides se encuentran en las plantas en su forma conjugada. La unión con glicósidos hacen a estos compuestos menos reactivos y más solubles, permitiendo ser almacenados en las vacuolas celulares, donde son comúnmente hallados (Markham, 1982; DuPont et al., 2000). La apigenina, otro de los compuestos ensayados, no fue detectada por el método utilizado, pero se logró el aislamiento por HPLC e identificación por espectrometría de masas de quercetina en la fracción metanólica (Fig. 3 A y 4 A respectivamente).

Los estudios fitoquímicos llevados a cabo en el presente trabajo permitieron el aislamiento, identificación de dos flavonoides a partir de extracto metanólico de capítulos secos de *Centaurea solstitialis* que podrían explicar la acción citoprotectora e inhibitoria sobre la motilidad gástrica. Los valores cuantificados de canferol y quercetina permitirán calcular la cantidad administrada en una dosis efectiva de extracto metanólico y éstas podrán ser utilizadas en posteriores bioensayos para confirmar si la actividad antiulcerosa está producida por estos compuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Beretz, A.; Stoclet, J.; Anton, R.** 1980. Inhibition of isolated rat aorta contraction by flavonoids. Possible correlation with cAMP phosphodiesterase inhibition. *Planta Med.*, 39: 236 - 237.
- Di Carlo, G.; Autore, G.; Izzo, A.A.; Maiolino, P.; Mascolo, N.; Viola, P.; Diurno, M.V.; Capasso, F.** 1993. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45: 1054 -1059.
- DuPont, M.S.; Mondin, Z.; Williamson, G.; Price, K.R.** 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3957 - 3964.
- Geissman TA.** 1962. *The Chemistry of Flavonoids Compounds*. Pergamon Press, Oxford, Inglaterra, pp. 72 - 76.
- Goel, R.K.; Maiti, R.N.; Tavares, I.A.** 1996. Role of endogenous eicosanoids in the antiulcer effect of kaempferol. *Fitoterapia*, 67: 548 - 552.
- Gros, E.G.; Pomilio, A.B.; Seldes, A.M.; Burton, G.** 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Editorial Secretaría General de la Organización de Estados Americanos, Washington D.C., Estados Unidos de Norteamérica, pp. 69 - 77.
- Hammad, H.H.; Abdalla, S.S.** 1997. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen. Pharmacol.*, 28: 767 - 771.
- Ivy, A.C.; Grossman, M.I.; Bachrach, W.H.** 1954. *Úlcera Péptica*. Ed. El Ateneo. Buenos Aires, Argentina, pp. 362 - 367.
- Lin, W.C.; Tan, T.W.** 1994. The role of gastric muscle relaxation in cytoprotection induced by San-huang-xie-xin-tang in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 44: 171 - 179.
- Markham, K. R.** 1982. *Techniques of flavonoids identification*. Ed. Academic Press. New York, Estados Unidos de Norteamérica, pp. 1 - 7.
- Martino, V.** 2000. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farm. Bon.*, 18: 303 - 308.

- Morales, M.A.; Lozoya, X.** 1994. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth muscle. *Planta Med.*, 60: 313 - 317.
- Pérez Guerrero, C.; Martín, M.J.; Marhuenda, E.** 1994. Prevention by rutin of gastric lesions induced by ethanol in rats: role of indogenous prostaglandins. *Gen. Pharmacol.*, 25: 575 - 580.
- Petkov, E.; Uzunov, P.; Kostova, I.; Somleva, T.; Ognyanov, I.** 1983. Inhibition of rat heart phosphodiesterase by some ratenoids and isoflavonoids. *Planta Med.*, 47: 237 - 239.
- Reyes, M.; Martín, C.; Alarcón de la Lastra, C.; Trujillo, J.; Toro, M.V.; Ayuso, M. J.** 1996. Antiulcerogenicity of the flavonoid fraction from *Erica andevalensis*. Cabezudo-Rivera. *Z Naturforsch.*, 51: 563 - 569.
- Seibl, J.** 1973. Propiedades del ion molecular. En: *Espectrometría de masas*. (J. Calderón, M. Stud, Eds.). Ed. Alhambra, Madrid, España, pp. 29 - 36.
- Shinoda J.** 1928. Color reactions of flavone and flavonol derivatives and the like. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 48: 214 - 220.
- Toso, R.E.; Skliar, M.I.** 1999. Efecto citoprotector de extractos de *Centaurea solstitialis* sobre lesiones gástricas inducidas por estrés en ratas. *Ciencia Veterinaria*, 1: 9 - 14.
- Toso, R.E.; Skliar, M.I.** 2000a. Efecto de la indometacina sobre la citoprotección de extractos de *Centaurea solstitialis* contra ulceras gástricas inducidas por estrés en ratones. *Ciencia Veterinaria*, 2: 16 - 20.
- Toso, R.E.; Skliar, M.I.** 2000b. Efecto de extractos de *Centaurea solstitialis* sobre el tránsito gastrointestinal en ratones. *Fitociencia*, 2: 10 - 12.