

POTENCIALIDADES ANTIMICROBIANAS DE LA GOSSYPITRINA AISLADA DE LAS FLORES DE *Talipariti elatum* S.W Y EVALUACIÓN DE ALGUNOS PARÁMETROS FARMACOGNÓSTICOS DE LAS FLORES

ANTIMICROBIAL POTENTIALITY OF GOSSYPITRINE ISOLATED FROM THE FLOWERS OF *Talipariti elatum* S.W AND SOME PHARMACOGNOSTIC STUDIES OF THE FLOWERS.

CUÉLLAR-CUÉLLAR, ARMANDO^{1*} Ph.D., ROJAS HERNÁNDEZ, NIDIA M² Ph.D.

¹Profesor Departamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. ²Profesora Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

*Correspondencia: mandyc@infomed.sld.cu

Recibido: 21-11- 2010; Aceptado: 07-05-2011.

Resumen

Las flores de *Talipariti elatum* S.W, se utilizan como antiasmáticas en la medicina tradicional en Cuba. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado la presencia de diferentes componentes químicos en ellas y en particular la estructura del gluco flavonoide Gossypitrina con altos rendimientos. Como continuación de estas investigaciones, en el presente trabajo se informan los resultados de algunos parámetros farmacognósticos para la posible calidad de las flores de esta planta como materia prima para su uso alternativo en medicina, así como la evaluación antimicrobiana de este flavonoide frente a cepas de diferentes microorganismos. Se evaluaron 13 cepas del género *Candida* y 26 cepas de otros microorganismos (19 Gram negativas y 7 Gram positivas). De ellas, se inhibieron en total 19 para un 53,85 % con valores promedio de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 29,6 mg/mL y de Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 27,6 mg/mL, por lo que se puede considerar que la actividad antibacteriana de este flavonoide es apreciable, y vale la pena realizar un estudio más detallado de esta actividad para determinar su posible uso alternativo en tratamientos antibacterianos en humanos o en medicina veterinaria. No se presentó actividad frente a 13 cepas de levaduras del género *Candida* evaluadas.

Palabras clave: *Talipariti elatum* S.W., efecto antimicrobiano, gossypitrina.

Abstract

Talipariti elatum S.W flowers are widely used in Cuba as antiasthmatic in traditional medicine. Our group have described many chemical components from the extracts of the plant, in particular the flavonoid glucoside Gossypitrin in high yields. To continue the investigation with the plant, in this paper is summarized some quality control evaluations of the possible raw material for pharmaceutical use of the flowers and its extracts in human or veterinary

alternative medicine. The antimicrobial activity of Gossypitrin is undertaken with 26 strains of bacteria and 13 strains of *Candida* species. From 26 bacteria strains evaluated, (19 Gram negative and 7 Gram positive), 19 were inhibited (53, 85 %) with the average in concentration for Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of 29, 6 mg/mL and for Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of 27, 6 mg/mL. Not antifungal activity against *Candida* strains was found. Those results suggest that Gossypitrin could be an interesting product to be evaluated as a possible alternative therapeutic agent for the treatment of infections in human or veterinary medicine.

Key words: *Talipariti elatum* S.W., antimicrobial activity, gossypitrin.

Introducción

La Gossypitrina es un flavonoide O-glucósido en la posición 7 de la estructura típica de un flavonoide polihidroxilado en las posiciones 3, 5, 8, 3' y 4' además de la posición 7 (Fig. 1). No es la única estructura presente en los extractos de los pétalos de las flores de *Talipariti elatum* S. W.

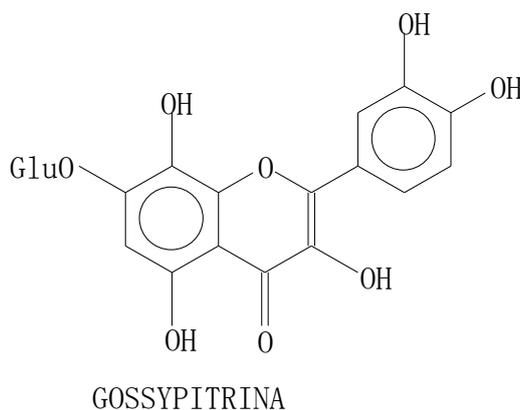


Figura 1. Estructura de Gossypitrina

Este compuesto se ha aislado de diversos tipos de flores, aunque en las especies del género *Hibiscus* es donde se ha encontrado su prevalencia de aparición junto con la Antocianidina roja que produce una asociación con este flavonoide que se conoce como efecto de copigmentación, por lo que generalmente aparecen asociados en los extractos de dichas flores. (DANGLES *et al.*, 1993).

En la literatura consultada no existen informes anteriores sobre posibles efectos biológicos de esta molécula, solo los publicados por nuestro grupo de trabajo (PEREZ-TRUEBA *et al.*, 2001; PEREZ-TRUEBA *et al.*, 2003, CUÉLLAR *et al.*, 2010,) y que se refieren a la evaluación de su posible efecto antioxidante

por el método de la hepatotoxicidad inducida por el tetracloruro de carbono y la medición del malonaldehído producido en homogenato de cerebro de ratas. En particular, ni los extractos de las flores ni la Gossypitrina como tal se han evaluado en cuanto a su posible efecto antimicrobiano lo cual constituye el aspecto central de la presente investigación por el buen rendimiento obtenido de este flavonoide y por tanto la disponibilidad de cantidades suficientes de producto puro para las evaluaciones.

En Cuba hay dos especies de plantas conocidas por “majagua”: *Hibiscus tiliaceus*, árbol pequeño y ramoso, y la majagua común o majagua azul, árbol que alcanza hasta cerca de 20 m de altura y que corresponde a *Talipariti elatum* S.W. especie considerada endémica y que hace un tiempo era clasificada como *Hibiscus elatum* S. W.

Sus flores en Cuba son muy apreciadas por la medicina tradicional como expectorante y antiasmática por ello el interés de comenzar las investigaciones con las mismas (ROIG, 1988).

La especie que crece en Cuba no tiene estudios químicos o biológicos, a no ser los de nuestro grupo de trabajo (MÁRQUEZ *et al.*, 1999), que describan su composición en cuanto a metabolitos secundarios o que confirmen su posible uso, aunque si otras especies del género *Hibiscus* estudiadas, donde se describe la Gossypitrina como uno de los componentes principales de las flores (DANGLES *et al.*, 1993).

Para su aislamiento en otras especies, se realiza una extracción de las flores completas con etanol, el residuo de extracción se reparte en disolventes tales como éter di etílico, cloroformo y acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se purifica en columnas de sílicagel con mezclas de acetato de etilo y metanol en un gradiente ascendente de polaridad, lo cual permite cristalizar entre otros, la Gossypitrina con rendimientos que oscilan alrededor del 0.1%. (NAIR *et al.*, 1961; SANKARA *et al.*, 1961; LOWRY, 1976).

Talipariti elatum S.W. es un árbol muy común en toda la isla de Cuba, que florece generalmente en dos períodos del año. Sus flores inicialmente amarillas, cambian su color a naranja y rojo antes de caer de la planta. Estas flores completas, se utilizan por la población en forma de decocción o fermentadas en forma de un vino con fines expectorantes y antiasmáticos (ROIG, 1988). Las flores de la planta son las que se estudian en el presente trabajo para evaluar sus componentes químicos y su actividad antimicrobiana “*in vitro*” para su posible uso en medicina humana o veterinaria.

Materiales y métodos

Las flores de *Talipariti elatum* S. W. (Fig. 2) se colectaron en los alrededores del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana en Mayo del 2009, separando las diferentes partes constitutivas antes del proceso de secado.



Figura 2. Flor de *Talipariti elatum* S.W.

La caracterización botánica se realizó en el Departamento de Sistemática del Jardín Botánico Nacional de Cuba, con una muestra para Herbario.

Los estudios farmacognósticos se realizaron de acuerdo a WHO/PHARM/80.50. Se evaluaron los siguientes parámetros de calidad de la materia prima vegetal: Secado en diferentes condiciones, determinación de humedad residual, determinación de cenizas, sólidos solubles extraíbles en diferentes disolventes y un tamizaje fitoquímico general de acuerdo a (CUÉLLAR *et al.*, 2010)

Extracción: Las diferentes partes de las flores de forma independiente (Cáliz, pétalos y pistilo con el polen), se someten a un proceso de extracción por disolventes sucesivos utilizando tolueno y etanol sobre el mismo material vegetal, de acuerdo con HOSTETTMANN *et al.* (1986). Para el aislamiento del flavonoide con el que se trabaja y evaluación de los parámetros farmacognósticos descritos, se utilizan de forma particular los pétalos separados de las otras partes de las flores por ser los que aportan los flavonoides objeto de las evaluaciones realizadas en la presente investigación.

Evaluación antimicrobiana: Para la evaluación antimicrobiana se utilizaron 19 cepas de bacterias Gram negativas y 7 cepas Gram positivas, así como 13 cepas de levaduras del género *Candida*. Todas fueron cepas de la colección ATCC, cuyos datos se registran en las tablas de los resultados para no duplicar información. La máxima concentración de Gossypitrina empleada para las determinaciones de CMI y CMB fue de 50 mg/mL en base a la solubilidad del flavonoide. Se utilizó Gentamicina y Nistatina como controles positivos de inhibición para los estudios microbiológicos realizados.

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar. Se prepara una capa fina de agar Nutriente estéril que se coloca en una placa Petri hasta su solidificación. Sobre esta capa se coloca una segunda capa de agar nutriente-inoculo que contiene una suspensión de cada cepa microbiana a evaluar. Una vez solidificadas ambas capas, se realizan cortes en el agar con un perforador estéril de 6 mm de diámetro y en el corte se coloca 100 μ L de las diferentes concentraciones de Gossypitrina a evaluar. Las placas se incuban por 24 horas a 37°C. Para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) se considera la menor concentración de este compuesto que forma un halo de inhibición del crecimiento en torno al corte de 10 mm de diámetro. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se determina realizando pases o resiembras de cada tubo con las diferentes concentraciones del compuesto a evaluar en la superficie de placas con agar nutriente para determinar la presencia y realizar el conteo de colonias (BIAVATI *et al.*, 2008). Todo el trabajo se realizó con tres repeticiones por cepa y concentración del compuesto.

Resultados y discusión

Estudio del secado: Dentro de las evaluaciones farmacognósticas usuales para poder utilizar un material vegetal se encuentra la evaluación del mejor método de secado que permite medir el mejor proceso y el menor tiempo para obtener un material de partida con la menor cantidad de agua que pueda interferir con los procesos de extracción o sobre la composición química del mismo si se necesita almacenarlo por algún tiempo.

En la Tabla 1 se muestran los resultados donde el método artificial en estufa permitió el secado en sólo tres días, la mayor cantidad en peso de pérdida de agua con un 73,5 % y una humedad residual del 10,7 % que es un valor que permite trabajar el material sin dificultades de acuerdo a lo establecido para plantas medicinales. Índices numéricos para la calidad de la materia prima:

Otros parámetros de calidad de la droga que se consideran útiles realizar después de secada la misma, son los que se relacionan a continuación con los siguientes resultados:

Las cenizas totales tuvieron un valor promedio de 10,5 % este valor es ligeramente alto en comparación con los valores que se refieren para la mayoría de las plantas medicinales comerciales, pero cuando se realiza la diferenciación con la determinación de las cenizas solubles en agua el valor encontrado fue de 8,6 % por lo que la diferencia es de 1,9% respecto al valor encontrado respecto a las cenizas totales lo cual asegura según lo establecido, que al estar dicho valor por debajo de un 3 % , no debe haber riesgos de tener grandes cantidades de metales pesados que puedan suministrar algún tipo de

toxicidad a los extractos preparados o interferir en los resultados de la evaluación antimicrobiana encontrada al tener toxicidad sobre los microorganismos evaluados. Se determinaron además los sólidos solubles (extractivos) en agua y etanol, siendo los extractivos desde agua menores que los obtenidos desde el etanol (22,5 % vs 33,7 %) lo cual asegura una mejor extracción en etanol de los componentes químicos de las flores.

Por su parte, el tamizaje fitoquímico de los extractos de agua y etanol mostraron los mismos resultados para los ensayos realizados:

Tabla 1. Resultado de las evaluaciones del secado de las flores.

Método	Días para secar	Pérdida en peso Por cada 100 g	Humedad residual (%)
Estufa 45 °C	3	73,5	10,7
Sombra	18	65,0	19,8
Sol	12	70,0	16,1

Para los extractos de los pétalos: Ensayos positivos para: Flavonoides, antocianinas, compuestos reductores y aminos libres. Para los extractos del pistilo con polen: Ensayos positivos para: Compuestos reductores y aminos libres. Para los extractos del cáliz: Ensayos positivos para: Triterpenoides y esteroides, flavonoides, compuestos reductores y aminos libres.

Como se puede apreciar de estos resultados hay diferencias en los componentes químicos de las partes por lo que se justifica la necesidad de separar las mismas de acuerdo a lo que se desea que contengan los extractos.

Rendimiento de los diferentes extractos por partes evaluadas: En la Tabla 2 se presentan los rendimientos de los diferentes extractos obtenidos. Como puede apreciarse, el polen es el que aporta los mayores rendimientos, aunque en este caso son carbohidratos y derivados y aminos libres de forma fundamental como composición química de acuerdo a los análisis realizados por el sistema de Cromatografía Gaseosa acoplada a Masa, teniendo los pétalos un buen rendimiento, el cual corresponde principalmente a los flavonoides, que son las estructuras químicas que más interesan por los beneficios biológicos descritos para los mismos y por ser los componentes aislados y caracterizados de esta parte de la flor en nuestros estudios.

Tabla 2. Rendimiento de sólidos totales por extracto y por las diferentes partes evaluadas.

Partes de las flores	Extracto de tolueno (%)	Extracto de etanol (%)
Pétalos	1,6	9,25
Polen	6,06	20,0
Cáliz	1,3	5,83

Componentes químicos aislados y caracterizados de los diferentes extractos de los pétalos de las flores: Para los extractos de desengrase se caracterizaron fundamentalmente ácidos grasos por la técnica de Cromatografía Gaseosa acoplada a Masas, así como un alto porcentaje de componentes hidrocarbonados de cadenas largas de hasta 40 átomos de carbono y una sola estructura de núcleo esteroidal relacionada con el núcleo del estigmastano.

Tolueno

Hidrocarburos > 20 % del peso del extracto total Glicerol, Ácido 3-4 dihidroxibenzoico, Ácido palmítico (C_{16:1}), Ácido oleico (C_{18:1}), Ácido esteárico (C_{18:0}), Ácido graso (C_{23:0}), Ácido graso (C_{25:0}), Ácido graso (C_{27:0}), Un esteroide con grupo carbonilo relacionado con el estigmasterol.

Etanol

En los extractos correspondientes al etanol se aislaron flavonoides, donde prevalece el glicósido Gossypitrina como componente de mayor rendimiento caracterizado por diferentes técnicas espectroscópicas ya publicadas (CUÉLLAR *et al.*, 2010). Antocianina > 0.1% precipitada del extracto en medio ácido, **Gossypitrina:** 1,25% de rendimiento a partir del material vegetal 13,5% de rendimiento a partir del extracto.

Actividad antimicrobiana del flavonoide Gossypitrina.

En la Tabla 3 se muestran los resultados para las cepas de *Salmonella* y *Shigella* evaluadas. Se puede apreciar que estas cepas Gram negativas son bastante resistentes a la concentración evaluada siendo sólo una cepa de *Salmonella* inhibida y si fue inhibida la única cepa de *Shigella* ensayada, ambas a concentraciones inferiores a la de partida.

Tabla 3. Valores de CMI y CMB de Gossypitrina para cepas de *Salmonella* y *Shigella*

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>Salmonella enterica</i> var Tiphy 7251	+	35	32
<i>Salmonella enterica</i> var Typhimurium 14028	-	no	no
<i>Salmonella entérica</i> var Enteriditis 13076	-	no	no
<i>Salmonella enterica</i> var Tiphy 19430	-	no	no
<i>Shigella flexneri</i> 12622	+	30	30

En la Tabla 4 se muestran los resultados de cepas variadas, donde se observa que sólo las cepas de *Bacillus*, *Providencia* y *Klebsiella* resultaron inhibidas, teniendo la última cepa valores de CMI y CMB muy por debajo de la concentración inicial de partida, por lo que es muy sensible a este flavonoide.

Tabla 4. Valores de CMI y CMB de la Gossypitrina para distintas bacterias evaluadas

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>Proteus mirabilis</i> 7002	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	+	50	50
<i>Serratia marcescens</i> 14056	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883	+	10	10
<i>Providencia</i> sp. C-3450	+	40	40
<i>Alcaligenes faecalis</i> 1460	-	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i> 29212	-	-	-

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la CMI y la CMB para las dos cepas de *E. coli* evaluadas, siendo sólo una de ellas inhibida a una concentración inferior de la inicialmente evaluada. Esta es una bacteria muy común en procesos infecciosos diversos, por lo que este resultado debe tenerse en cuenta para trabajos futuros con los flavonoides aislados de la planta.

Tabla 5. Valores de CMI y CMB de la Gossypitrina para cepas de *E. coli*

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>E. coli</i> 35150	+	20	20
<i>E. coli</i> 25922	-	-	-

En la Tabla 6 se muestran los resultados para las dos cepas de *Citrobacter*, (Gram negativos) evaluados. Ambas cepas fueron inhibidas y sufrieron efectos letales por acción de la Gossypitrina, pero sólo una de ellas a concentraciones inferiores a la inicialmente utilizada de 50 mg/mL.

Tabla 6. Valores de CMI y CMB de Gossypitrina para cepas de *Citrobacter*

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>Citrobacter freundii</i> 10625	+	30	30
<i>Citrobacter freundii</i> 8090	+	50	50

De igual forma, en la Tabla 7 se muestran los resultados para las dos cepas de *Proteus*, (bacterias Gram negativas) evaluadas. De ellas, sólo una se inhibió a concentraciones muy inferiores a la inicialmente utilizada de 50 mg/mL, por lo que en este caso los resultados son altamente apreciados. Sobre esa misma cepa (13315) la Gossypitrina presentó efecto bactericida.

Tabla 7. Valores de CMI y CMB de Gossypitrina para cepas de *Proteus*

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>Proteus mirabilis</i> 12453	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 13315	+	10	5

En la Tabla 8 se muestran los resultados para las cepas de *Staphylococcus* evaluadas. Estas bacterias Gram positivas son una de las causas más frecuentes de infecciones y son las que han presentado mayor resistencia a los antimicrobianos comerciales, por lo que el hecho de que solo una cepa no fuera inhibida permite que se pueda evaluar este flavonoide con un posible antimicrobiano natural alternativo para hacer algunas valoraciones en infecciones *in vivo* debido a su baja toxicidad encontrada por nuestro grupo de trabajo.

Tabla 8. Valores de CMI y CMB de Gossypitrina para cepas de *Staphylococcus*

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>S. aureus</i> 6538	-	-	-
<i>S. aureus</i> 33862	+	20	20
<i>S. aureus</i> 25923	+	50	50
<i>S. aureus</i> clínico	+	20	20
<i>S. epidermidis</i> 12228	+	5	5

El último grupo de cepas evaluadas se muestran en la Tabla 9 para otras especies Gram positivas del género *Enterococcus*. Una sola cepa se inhibió a concentraciones inferiores a la inicialmente evaluada.

Tabla 9. Valores de CMI y CMB de Gossypitrina para cepas de *Enterococcus*

Cepa	Resultado	CMI mg/mL	CMB mg/mL
<i>Enterococcus cloacae</i> 23353	-	-	-
<i>Enterococcus aerogenes</i> 13048	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> 6056	+	30	30

Se evaluaron 13 cepas del género *Candida*, pero ninguna resultó inhibida por el flavonoide.

En resumen, se puede concluir que de las 26 cepas de microorganismos evaluados, 19 bacterias Gram negativas y 7 Gram positivas, se inhibieron un total de 19 para un 53,85 %, con concentraciones promedios de CMI de 29,6 mg/mL y de CMB de 27,6 mg/mL, por lo que se puede considerar que la actividad antimicrobiana de este flavonoide frente a cepas de bacterias es apreciable y vale la pena realizar un estudio más detallado de esta actividad para determinar su posible uso alternativo en tratamientos antibacterianos en humanos o en medicina veterinaria ya que aunque los resultados están en todos los casos entre un 45-72 % respecto a los controles positivos los flavonoides son estructuras químicas con menor toxicidad reconocida y pudieran ser una posible terapia alternativa a considerar. Se destaca que los controles positivos sólo se utilizan en el tamizaje inicial para seleccionar las cepas que se someten a la determinación de la CMI y la CMB y se seleccionan las cepas que tengan una inhibición no menor del 40 % respecto al control positivo.

Referencias

BIAVATI, R.; PICEAGLIA, B.; MAROTTI, M. .2008 Antimicrobial activity of plant essential oils'. Dep. of Agro environmental Science and Technology University of Bologna. Disponible en: <http://www.ienica.net/italyseminar/greenchem/biavatipresentation.pdf>
Consultado: 05.03-2008.

CUÉLLAR, A.; GONZÁLEZ, J. 2010. Obtención del glucósido flavonoide Gossypitrina de los pétalos de las flores de *Talipariti elatum* S. W. y evaluación de su posible efecto antioxidante. RECIA 2 (2) (En prensa)

DANGLES, D.; SAITO, N.; BROUILLARD, R. 1993. Copigment association of flavonoids with anthocyanins in plants. Phytochemistry 34(1):119-124.

LOWRY, J.B. 1976. Floral anthocyanins of some Malasian Hibiscus species. Phytochemistry 15:1395-1396.

MÁRQUEZ, I; CUELLAR, A; MARTÍNEZ, J. LORA, J. Y COL. 1999. "Estudio fitoquímico de la especie Hibiscus elatus S.w". Revista Cubana de Farmacia 33 (2):127-131.

NAIR A.G.R.; SUBRAMNIAN, S.; NAYARA-SWAMUN, S. 1961. Glycosides from flowers of Hibiscus tiliaceus. J. Sci. Ind. Research 20B:553-55.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, A.; MARSON, A. 1986 *Preparative chromatography Techniques*. Disponible en: http://books.google.com.co/books?id=Y_BnxeX-cWqC&printsec=frontcover&dq=Preparative+chromatography+Techniques&source=bl&ots=n8VPNXkhah&sig=EHReIVbU2bVxS_N59q4a551zQ5U&hl=es&ei=EWvpTKHMOsWBIAexpl2uCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBoQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false. Consultado: 12-10-2010.

PEREZ-TRUEBA, G.; RAMOS-GUANCHE, C.; MARTINEZ-SANCHEZ, B.; MARQUEZ-HERNANDEZ, I.; GIULIANI, A.; MARTINEZ-SANCHEZ, G. 2003. Protective effect of gossypitrin on carbon tetrachloride-induced in vivo hepatotoxicity. Redox Report 8(4):215-221.

PEREZ, T. G.; MARTINEZ, S.B.; MARQUEZ, H.I.; RAMOS, G.C. 2001. Evaluation of the antioxidant activity of gossypitrin by in vitro and in vivo assays. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 32(2):19-24.

ROIG, J.T. 1988. *Plantas Aromáticas, Venenosas y Medicinales de Cuba*. Editorial Científico Técnica, Habana Cuba.

SANKARA, S.S.; NARAYAMA M.S. 1961. Pigments of the flowers of Hibiscus tiliaceus. J. Sci. Ind. Research 20B:133-134.