

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE UNA FRACCIÓN DE BIFLAVONOIDES DE *Garcinia madruno*: SU INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LDL HUMANA Y SU MECANISMO DE ESTABILIZACIÓN DE ESPECIES RADICALARIAS

PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A BIFLAVONOID FRACTION FROM *Garcinia madruno*: INHIBITION OF HUMAN LDL OXIDATION AND ITS FREE RADICAL SCAVENGING MECHANISM

Edison OSORIO D.^{1,2*}, Guillermo MONTOYA P.¹, Jaume BASTIDA²

Recibido: Marzo 24 de 2009 Aceptado: Septiembre 22 de 2009

RESUMEN

A una fracción biflavonoide (FB) caracterizada fitoquímicamente de *Garcinia madruno* (Clusiaceae), se le evalúa su potencial inhibitorio de la oxidación de LDL y su capacidad estabilizadora de especies radicalarias, correlacionando dichas actividades con su contenido en biflavonoides. Los biflavonoides morelloflavona, volkensiflavona y amentoflavona se identifican a partir de la FB. El extracto que contiene la FB (extracto AcOEt) se determina como el principal factor involucrado en la actividad estabilizadora de radicales libres de esta especie vegetal, obteniendo la actividad estabilizadora del radical DPPH^{*} a una concentración de 4,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La peroxidación inducida con CuSO_4 de las lipoproteínas de baja densidad, se reduce significativamente en presencia de FB ($\text{CE}_{50} = 11,85 \mu\text{g}/\text{mL}$). El biflavonoide morelloflavona se determina como el principal responsable de la protección ejercida por la FB frente a la actividad estabilizadora de radicales libres y la peroxidación lipídica, aunque posiblemente existan procesos de sinergismo. Estas propiedades sugieren que la FB de *G. madruno* es un excelente candidato para ser utilizado como antioxidante.

Palabras clave: *Garcinia madruno*, Clusiaceae, biflavonoides, antioxidante, DPPH, peroxidación lipídica.

ABSTRACT

The inhibitory LDL oxidation potential and free radical stabilization capacity of a characterized biflavonoid fraction (FB) was evaluated and correlated by its biflavonoid content. Morelloflavone, volkensiflavone and amentoflavone were identified in the FB. The extract containing the FB (AcOEt extract) was found to be the major contributor to the free radical-scavenging activity of *G. madruno*. The DPPH activity for the FB was 4.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Lipid peroxidation, induced with CuSO_4 , was significantly reduced in the presence of the FB ($\text{CE}_{50} = 11.85 \mu\text{g}/\text{mL}$). Morelloflavone was found to be the main biflavonoid in the fraction responsible for its protection against lipid peroxidation and free radical-scavenging activity, although processes of synergy are possible. These properties suggest that the FB of *G. madruno* is an excellent candidate for use as an antioxidant.

Keywords: *Garcinia madruno*, Clusiaceae, biflavonoids, antioxidant, DPPH, lipid peroxidation.

1 Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

2 Departament de Productes Naturals. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. Avda Diagonal 643, 08028. Barcelona, Spain.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: josorio@farmacia.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

El oxígeno está asociado a las condiciones de vida aerobia y representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y la viabilidad celular, al mismo tiempo que entraña un peligro debido a sus características paramagnéticas, responsables de la formación de intermediarios dotados de una alta reactividad, conocidos como especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés "Reactive Oxygen Species") (1). La formación de ROS es un proceso natural, constante, inevitable y beneficioso para la supervivencia; no obstante, si estas especies reactivas se encuentran en exceso serán perjudiciales para el organismo. Así pues, son necesarias defensas antioxidantes que los neutralicen, manteniendo un equilibrio entre las especies reactivas y los antioxidantes (2). En este contexto, el estrés oxidativo se puede definir como el estado en el cual el nivel de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes del organismo, como resultado de un desequilibrio entre los sistemas de formación y eliminación (3, 4). Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre esta situación de desequilibrio y una serie de procesos fisiológicos y patológicos que limitan la calidad y la expectativa de vida (5, 6). Mientras en un principio se señaló que los organismos que vivían más años eran aquellos que tenían una tasa metabólica inferior, actualmente se ha demostrado que son los que poseen las mejores defensas antioxidantes (3).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo numeroso de metabolitos secundarios considerados como antioxidantes naturales, además de presentar otras funciones biológicas importantes (7). En los últimos años ha cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles, y en especial la evaluación de su capacidad antioxidante. Estos compuestos actúan a menudo de forma sinérgica con las vitaminas C y E, aumentando y prolongando los beneficios de las mismas (8, 9). Se ha comprobado su capacidad para actuar como dadores de electrones o quelantes de iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (8). Las LDL están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias y, además, está ampliamente aceptado que la oxidación de estas lipoproteínas es un punto de inicio de la lesión arterial (10, 11). Que el estrés oxidativo contribuye a la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares se constató gracias a

las observaciones realizadas en las modificaciones que sufrían las LDL al ser oxidadas y posteriormente convertidas a sus formas aterogénicas (oxLDL) y reconocidas por receptores "scavenger" de macrófagos, los cuales favorecen la formación de células espumosas (11).

Entre los compuestos fenólicos destacamos los flavonoides, cuyas propiedades antioxidantes se deben a la protección de los tejidos frente a las ROS y a la peroxidación lipídica (12). Por su parte, los biflavonoides, dímeros de flavonoides unidos por un enlace inter-flavonoide de tipo C-O-C o C-C, presentan menos evidencias desde el punto de vista biológico; sin embargo, entre sus propiedades se encuentran las actividades antiinflamatoria, antiartrítica y antioxidante (13, 14), asociadas con la habilidad de suprimir especies reactivas de oxígeno y de inhibir enzimas como la fosfolipasa A₂ y la ciclooxigenasa (14, 15).

En nuestra continua investigación de metabolitos biológicamente activos a partir de la flora colombiana, en el presente trabajo reportamos el aislamiento de una fracción biflavonoide de *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel (Clusiaceae), su caracterización fitoquímica y la evaluación de su efecto antioxidante por dos mecanismos diferentes, la inhibición de la peroxidación lipídica de las LDL, así como la captación del radical libre DPPH[•], dos procesos que acarrearán daño vascular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las partes aéreas (hojas y ramas) de *G. madruno* se recolectaron en Julio de 2004, en predios de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). Las muestras fueron identificadas por el Dr. Fernando Alzate, y un espécimen (Alzate-3030) se depositó en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA).

Extracción, fraccionamiento y purificación de la FB y de los biflavonoides puros

Se extrajeron ramas y hojas secas de *G. madruno* (1,8 Kg) a temperatura ambiente con hexano y posteriormente con AcOEt (720 g). Una porción del extracto de AcOEt (50 g) se fraccionó por diferentes técnicas cromatográficas como exclusión por tamaño, cromatografía líquida al vacío y cromatografía en columna para obtener la fracción purificada

de biflavonoides (FB) (2,2 g). Una porción de FB (200 mg) se separó por cromatografía en capa fina preparativa para obtener moreloflavona [1] (127,9 mg), volkensiflavona [2] (32,8 mg) y amentoflavona [3] (15,9 mg). Los biflavonoides conocidos se identificaron por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos (CD, IR, EM, RMN ^1H y ^{13}C y RMN 2D) con los datos previamente reportados en la literatura (16-21).

Actividad captadora del radical libre DPPH $^{\bullet}$

El efecto de cada uno de los biflavonoides y de la fracción biflavonoide (FB) sobre el radical DPPH $^{\bullet}$ se determinó mediante el procedimiento descrito por Brand-Williams y col. (22). Así, una alícuota (500 μL) de las soluciones que contenía diferentes concentraciones de FB y de los biflavonoides se adicionó a 1000 μL de una solución metanólica de DPPH $^{\bullet}$ (0,02 mg/mL). La absorbancia a 517 nm se midió cada dos minutos, en un espectrofotómetro Varian CaryBio 50, hasta que la reacción se estabilizó. La concentración de DPPH $^{\bullet}$ a diferentes tiempos de reacción ($[\text{DPPH}^{\bullet}]_T$) se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación de la recta:

$$A_{517\text{nm}} = 31,63 [\text{DPPH}^{\bullet}]_T - 0,01686 \quad \text{Ecuación 1.}$$

Con un coeficiente de regresión lineal de 0,99, y una desviación estándar de 0,004351. El porcentaje del radical DPPH $^{\bullet}$ remanente ($[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{REM}}$) fue calculado por la siguiente expresión:

$$\%[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{REM}} = ([\text{DPPH}^{\bullet}]_T / [\text{DPPH}^{\bullet}]) * 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

El modelo de la curva dosis-respuesta obtenido al correlacionar el porcentaje de DPPH $^{\bullet}$ remanente frente a la concentración de antioxidante, permite calcular la cantidad de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del radical libre (CE_{50}) (23).

La cantidad de DPPH $^{\bullet}$ estabilizado se estimó para los primeros cuatro minutos de reacción en una concentración de compuesto cercana al valor de CE_{50} . Estos valores fueron convertidos a una relación dividiéndolos por el total de DPPH $^{\bullet}$ reducido en el estado estable. Esta relación fue denominada Índice de Reducción ($\text{RI}t5'$), un parámetro cinético que mide la velocidad de reacción para la reducción del DPPH $^{\bullet}$ (24). Todos los parámetros fueron calculados gráficamente utilizando el software GraphPad 4.0 (Prism, USA).

Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Aislamiento de LDL

La fracción de LDL fue obtenida por ultracentrifugación, aplicando un gradiente discontinuo de densidad en un equipo Beckman XL-100, utilizando un rotor SW-55Ti y tubos ultraclear de 5 mL (Ted Wilsona). Se parte de 50 mL de plasma procedente de voluntarios sanos y no fumadores (20-25 años), centrifugando a 2.500 rpm y 4°C con citrato de sodio como anticoagulante (10,6 μmol citrato de sodio/mL de sangre). La fracción quilomicrones-VLDL fue obtenida adicionando 1,6 mL de NaCl (1,0 g/mL) a 3,2 mL de plasma y centrifugando a 5°C por un periodo de 12 h a 49.500 rpm. La fracción superior (1,6 mL) se retiró y se adicionaron 1,6 mL de KBr (1,2 g/mL), centrifugando de nuevo a 5°C durante 18 h a 49.500 rpm. Se utilizó la SDS-PAGE para confirmar la pureza de las fracciones colectadas.

Cuantificación del contenido proteico

La fracción LDL obtenida por ultracentrifugación se cuantificó utilizando el ensayo estándar mediante espectrofotometría (Protein Quantification Kit-Rapid de Fluka).

Oxidación de la LDL

400 μL de LDL a una concentración de 430 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se preincubaron durante 15 minutos con 50 μL de los biflavonoides y de FB a diferentes concentraciones. La oxidación se inició con la adición de 50 μL de una solución de CuSO_4 (100 μM) y se mantuvo la reacción a 37°C durante 12 h. El proceso se detuvo con la adición de 25 μL de una solución al 1% de EDTA, enfriando en un baño de hielo durante 15 minutos.

Determinación TBARS

Los productos de la peroxidación lipídica, principalmente malondialdehído (MDA), formados durante el proceso de oxidación, se midieron en un espectrofotómetro Varian CaryBio 50 aplicando el método TBARS (thiobarbituric acid reactive substances). Para ello se adicionó 1,0 mL de una solución que contiene: 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA), 15% de ácido tricloroacético (TCA) y 0,1 N de HCl, a 0,5 mL de la solución de oxidación de la LDL. El cromóforo obtenido a partir del TBA y el MDA, se forma a 95°C al cabo de 60 min. La solución se filtró a través de ésteres de metilcelulosa (0,2 micrones).

Las lecturas de tres experimentos independientes se realizaron a 532 nm, y la cantidad de equivalentes de malondialdehído (MDA) formados se calculó usando un coeficiente de extinción molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (25).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fitoquímica

A partir de una fracción biflavonoide (FB) obtenida a partir del extracto desengrasado de *G. madruno* se obtuvieron tres compuestos (Véase figura 1), dos biflavonoides de tipo flavanona-(3 \rightarrow 8 \rightarrow)-flavona, morelloflavona [1] y volkensiflavona [2], y el biflavonoide flavona-(3 \rightarrow 8 \rightarrow)-flavona, amentoflavona [3], en una proporción aproximada de 8:2:1.

La determinación del compuesto [1] se basó en el análisis de los datos espectroscópicos de RMN ^1H (Véase tabla 1). El espectro de RMN ^1H realizado en DMSO- d_6 y CD $_3$ OD a temperatura ambiente,

muestra que las señales principales están acompañadas por otras de menor intensidad con similares desplazamientos químicos. El espectro de RMN ^{13}C a temperatura ambiente fue igualmente complejo. La duplicación de señales en los compuestos [1] y [2] sugiere la existencia de dos conforméromos a temperatura ambiente debido a su comportamiento rotamérico (atropisomerismo) (16, 26). La principal razón de la existencia de tales conforméromos son las restricciones de rotación alrededor del enlace C3 \rightarrow C8 \rightarrow . El aumento de la temperatura revela cambios en el espectro de RMN ^1H (Véase figura 2). A 100°C (temperatura máxima utilizada en este experimento), se observó un grupo simple de señales a partir de un único conforméromos. Pasada una hora, y utilizando la misma muestra a 25°C, el espectro de RMN ^1H mostró el mismo radio de los dos conforméromos. Este experimento de RMN a temperatura variable confirmó la presencia de dos conforméromos distintos del compuesto, [1a] y [1b] en solución a temperatura ambiente.

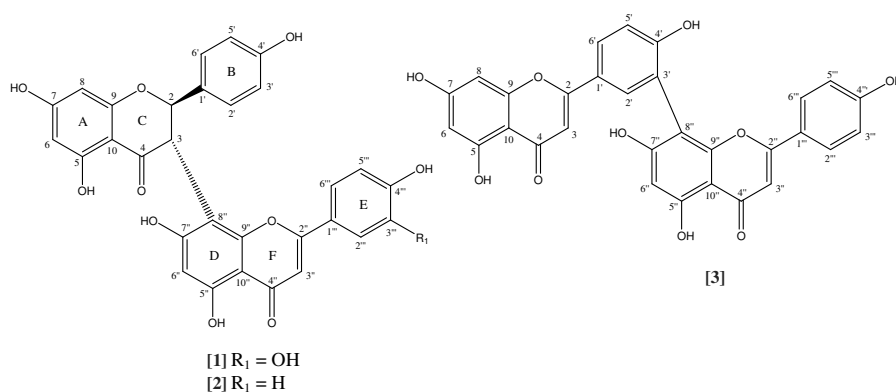


Figura 1. Biflavonoides aislados de la FB de *G. madruno*.

Tabla 1. Datos de RMN ^1H a 25°C de morelloflavona [1] y volkensiflavona [2] en DMSO- d_6 , y de amentoflavona [3] en CD $_3$ OD, σ in ppm, J in Hz.

	[1a]	[1b]	[2a]	[2b]	[3]
H-2	5,74 d (11,5)	5,58 d (12,5)	5,71 d (12,4)	5,53 d (12,4)	–
H-3	4,84 d (11,5)	5,00 d (12,0)	4,90 d (12,4)	4,98 d (12,4)	6,57 s
H-6	5,95 brs	5,99 brs	5,92 brs	6,01 s ^a	6,15 d (2,0)
H-8	5,95 brs	5,96 brs	5,92 brs	5,96 s ^a	6,36 d (2,0)
H-2'	7,14 d (9,0)	7,09 d (8,5)	7,09 d (8,4)	7,08 d (8,4)	7,95 d (2,0)
H-3'	6,38 d (8,5)	6,60 d (8,5)	6,35 d (8,4)	6,58 d (8,4)	–
H-5'	6,38 d (8,5)	6,60 d (8,5)	6,35 d (8,4)	6,58 d (8,4)	7,08 d (8,8)
H-6'	7,14 d (9,0)	7,09 d (8,5)	7,09 d (8,4)	7,08 d (8,4)	7,85 d (2,0; 8,8)
HO-5	12,28 s	12,16 s	12,32 s	12,20 s	–
H-3''	6,52 s	6,58 s	6,18 s	6,03 s	6,56 s
H-6''	6,16 s	6,03 s	6,57 s	6,72 s	6,34 s
H-2'''	7,40 brs	7,23 d (2,0)	7,88 d (8,8)	7,59 d (8,8)	7,50 d (8,8)
H-3'''	–	–	6,93 d (8,8)	6,62 d (8,8)	6,69 d (8,8)
H-5'''	6,89 d (8,5)	6,49 d (8,0)	6,93 d (8,8)	6,62 d (8,8)	6,69 d (8,8)
H-6'''	7,39 brd (8,5)	6,96 dd (2,0, 8,0)	7,88 d (8,8)	7,59 d (8,8)	7,50 d (8,8)
OH-5''	13,03 s	12,96 s	13,01 s	12,88 s	–

Las series **a** y **b** representan los conforméromos principal y minoritario, respectivamente, a 25°C.

^a Las señales pueden ser intercambiables.

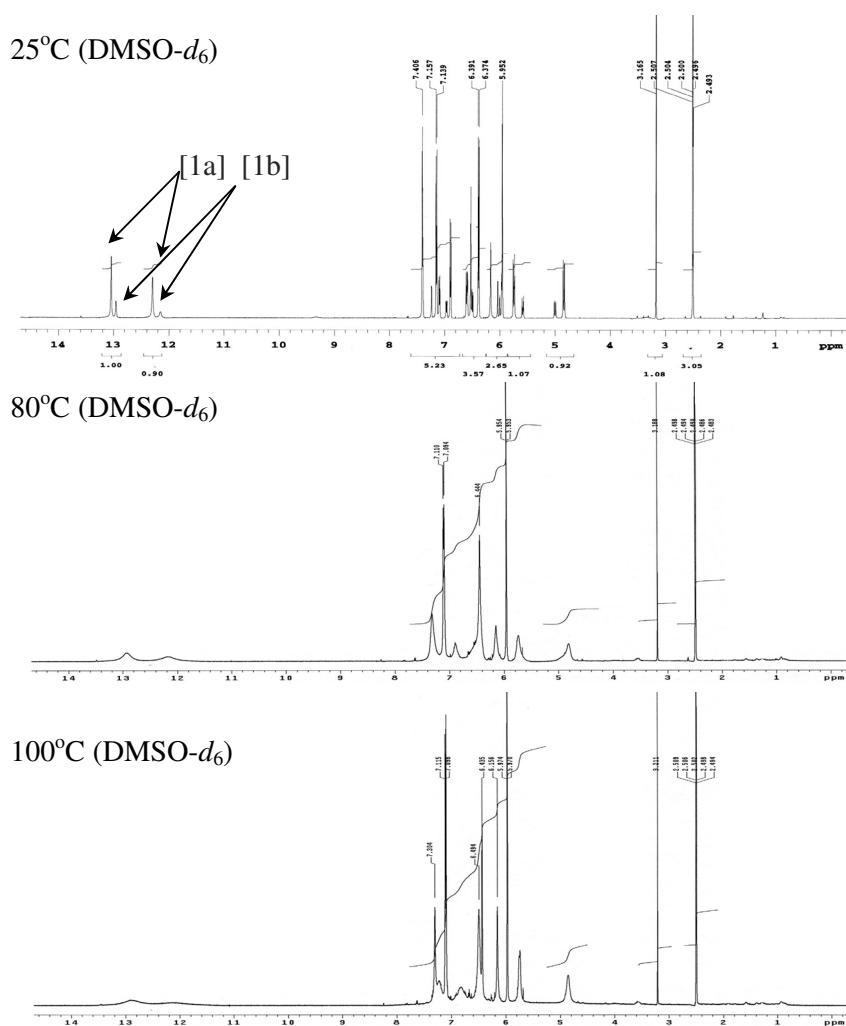


Figura 2. Experimento de RMN ^1H (Bruker DMX500) a temperatura variable de morelloflavona [1].

Para facilitar la asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C a temperatura ambiente de los dos conformeros del compuesto [1a] y [1b] en solución, se utilizaron experimentos de RMN 2D incluyendo COSY, HMQC y HMBC. Para el conformero minoritario [1b], se asignaron solamente las señales de RMN ^1H ya que las señales de RMN ^{13}C fueron, generalmente, de baja intensidad (Véase tabla 1). El espectro ^1H mostró la presencia de un protón aromático a $\sigma = 6,16$ asignado a H-6". El singulete ancho para dos protones a $\sigma = 5,95$, se asignó a los protones H-6 y H-8. El protón H-3" mostró un singulete a $\sigma = 6,52$. Basándonos en la correlación ^1H - ^1H (COSY), en la correlación heteronuclear a larga distancia (HMBC) y en las constante de acoplamiento, los dos dobletes que integran para cuatro protones aromáticos a $\sigma = 7,14$ ($d, J = 9,0$) y $6,38$ ($d, J = 8,5$) se asignaron al sistema A_2B_2

(H-2'/6' y H-3'/5', respectivamente). Los protones del anillo E muestran un patrón ABX consistente para un sistema de protones que acoplan en posición *orto* a $\sigma = 6,89$ ($d, J = 8,5$) asignado a H-5"', un doblete ancho a $\sigma = 7,39$ ($brd, J = 8,5$) correspondiente a H-6"' y un singulete ancho a $\sigma = 7,40$ correspondiente con H-2"". Este sistema fue confirmado por HMBC. La estereo-estructura relativa del compuesto [1] fue identificada por poseer una relación *trans* entre las posiciones 2 y 3 debido a la constante de acoplamiento de $J_{2,3} = 11,5$ Hz. La correlación a larga distancia (HMBC) fue útil en la asignación de los carbonos cuaternarios. Entre las principales correlaciones a tres enlaces, están la del H-2 con los correspondientes C-4, C-2', C-6' y C-8"', las cuales fueron útiles para designar una unión inter-flavonoide de tipo C3→C8". La configuración absoluta del compuesto [1] se confirmó

por su curva de dicroísmo circular (CD) como 2*R*,3*S* (16). La inspección en la curva de CD indicó efectos Cotton positivos para las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ alrededor de 345 y 285 nm, respectivamente. La alta amplitud del efecto Cotton positivo sobre 285 indica una orientación β del anillo B y, por lo tanto, una configuración absoluta 2*R* (16). Teniendo en cuenta los datos de CD y las constantes de acoplamiento del espectro de RMN ^1H del compuesto [1] ($J_{2,3}$, ca. 11,5 Hz), se facilita la asignación de una configuración relativa de las posiciones 2,3 en *trans* y una configuración absoluta 3*S*. A partir de los datos espectroscópicos mostrados, el compuesto [1] se halló estructuralmente idéntico al biflavonoide morelloflavona (16,17).

El compuesto [2] mostró similar complejidad en el espectro de RMN ^1H que el compuesto [1], fenómeno característico de biflavonoides con enlace inter-flavonoide C3 \rightarrow C8''. Sin embargo, mientras que [1] presentó un simple sistema A₂B₂, los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto [2] mostraron dos sets de señales aromáticas debido al sistema A₂B₂ adicional del anillo E (Véase tabla 1). El compuesto [2] se identificó como volkensiflavona, por comparación de sus datos físicos y espectrales con los reportados para este compuesto en la literatura (21).

La determinación del compuesto [3] se basó en el análisis de los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C . El espectro de RMN ^1H (400 MHz), tomado en CD₃OD, mostró dos señales a $\sigma = 6,15$ ($d, J = 2,0$ Hz) y $6,36$ ($d, J = 2,0$ Hz), las cuales se asignaron a H-6 y H-8, respectivamente, en concordancia con el experimento COSY. Al no presentarse un doblete similar para H-6'' y H-8'', el anclaje entre las unidades flavonoides podría involucrar a C-6'' o C-8''. Un patrón ABX consistente en un doblete a $\sigma = 7,08$ ($d, J = 8,8$ Hz), un doblete a $\sigma = 7,85$ ($dd, J = 2,0; 8,8$ Hz) y un doblete a $\sigma = 7,95$ ($d, J = 2,0$ Hz) se asignó a H-5', H-6' y H-2', respectivamente. Se observó también un sistema A₂B₂ asignado a los cuatro protones aromáticos, H-2'''/H-6'''-H-3'''/H-5''', como dos dobletes a $\sigma = 7,50$ ($d, J = 8,8$ Hz) y a $\sigma = 6,69$ ($d, J = 8,8$ Hz), respectivamente. Además, la presencia de tres singuletes a $\sigma = 6,57; 6,56$ y $6,34$ asignables a H-3, H-3'' y H-6'' excluyó la posibilidad de cualquier unión entre las unidades flavonas en C-3'' o C-6'' con C-3'. La posición de unión de las dos unidades de flavonas se confirmó por el experimento HMBC como C3' \rightarrow C8'' en base a la correlación a tres enlaces HMBC entre el H-2' y

el C-8''. Acorde con los resultados, el compuesto [3] se determinó como amentoflavona, un biflavonoide con anclaje C3' \rightarrow C8''-interflavonoide, en concordancia con investigaciones previas (19, 21).

Tabla 2. Actividad captadora de radicales libres, cinética de reducción inicial (RIt5') e inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de **FB** y de los biflavonoides aislados de *G. madruno*.

Muestra	DPPH'		LDL
	CE ₅₀ [$\mu\text{g}/\text{mL}$, (μM)] ^a	RIt5'	CE ₅₀ [$\mu\text{g}/\text{mL}$, (μM)] ^a
FB	4,50	0,84	11,85
Morelloflavona [1]	4,34 (7,80)	0,86	12,36 (22,23)
Volkensiflavona [2]	4,94 (9,14)	0,83	20,57 (38,09)
Amentoflavona [3]	66,53 (120,00)	0,75	91,34 (169,77)
Quercetina [Q]	7,06 (23,36)	0,85	25,06 (82,91)

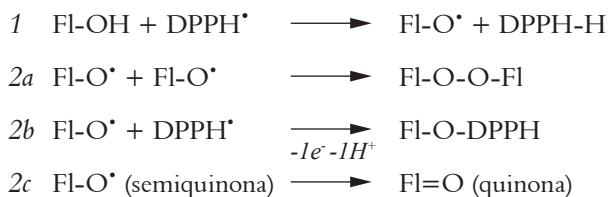
^a Los valores de CE₅₀ se han expresado en términos de $\mu\text{g}/\text{mL}$ y μM para los compuestos puros, y en $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la fracción FB.

Los valores son el promedio de 3 réplicas independientes.

Caracterización antioxidante

La comparación de la capacidad de cada biflavonoide para atrapar el radical DPPH' se efectuó en términos de concentración μM , mientras que la importancia relativa de la FB se expresó en términos de $\mu\text{g}/\text{mL}$. La fracción FB y los biflavonoides morelloflavona [1] y volkensiflavona [2] promovieron la estabilización del radical DPPH', con valores de CE₅₀ de 4,50; 4,34 y 4,94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Véase tabla 2). La menor actividad fue observada para la amentoflavona [3] (un biflavonoide flavonoflavona), con un valor de CE₅₀ superior a 100 μM , lo cual está en concordancia con publicaciones anteriores (27, 28). Es interesante destacar que compuestos como [1] presentaron la mayor actividad captadora de radicales libres mediante el ensayo del DPPH', entre los biflavonoides aislados de *G. xanthochymus*; sin embargo, en reportes previos, su CE₅₀ estaba alrededor de los 60 μM (27). Diferencias en los procedimientos del ensayo y los medios de solubilización de los compuestos podrían explicar dicho fenómeno. La quercetina [Q] se utilizó como control positivo en este ensayo, mostrando una actividad de 23,36 μM . Cabe mencionar que [Q] es un flavonoide monomérico y que su actividad en términos de $\mu\text{g}/\text{mL}$ presenta unos niveles de CE₅₀ equivalentes a los de los biflavonoides activos (7,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Generalmente es aceptado que la combinación de la sustitución 3',4'-dihidroxi (catecol) en el anillo B, con un doble enlace entre C-2 y C-3 y una función carbonilo en la posición C-4, son requerimientos estructurales esenciales para la estabilización del radical aroxil flavonoidal (29, 30). Nuestros resultados confirman dichas observaciones. De hecho, las reacciones más aceptadas para definir la capacidad de captación de radicales libres, las cuales son inicialmente atribuidas a la alta reactividad de los sustituyentes hidroxilo, son (31):



La reacción 2a representa el acoplamiento entre dos radicales flavonoides (dimerización), la reacción 2b el acople entre un radical flavonoide con un radical DPPH[•] y la reacción 2c representa, probablemente, el mecanismo de terminación predominante, el cual se produce mediante la formación de una quinona, más estable, a partir de una semiquinona, por pérdida de 1 electrón (31, 32). Por lo tanto, el grupo catecol en el anillo B de

los flavonoides (anillo E en biflavonoides), es el principal grupo funcional en lo concerniente a la actividad antioxidante (33, 34). Los biflavonoides con 2 grupos hidroxilos adyacentes en el anillo E, tales como el compuesto [1], son más efectivos que sus equivalentes monohidroxilos. El mecanismo predominante de la acción es probablemente vía donación de un electrón por parte del flavonoide, formándose una semiquinona, la cual dona un electrón adicional para formar una *orto*-quinona por deslocalización electrónica (Véase figura 3). Para compuestos como la amentoflavona, que contiene un grupo 4'-monohidroxilo en el anillo E, el mecanismo de acción implica probablemente la formación de radicales fenoxilo, los cuales son relativamente menos estables y captadores débiles de radicales libres (12, 34). El doble enlace entre C-2 y C-3 y la función carbonilo en la posición C-4, son importantes para la actividad antioxidante; sin embargo, no son suficientes por si solos para proveer actividad captadora de radicales libres.

La CE₅₀ es un parámetro ampliamente utilizado para describir la habilidad de un compuesto o extracto para atrapar el radical DPPH[•]. Sin embargo, los valores de CE₅₀ dan poca información, en términos de velocidad, en relación con la cinética de una reacción (24, 35). Es por ello que, para completar

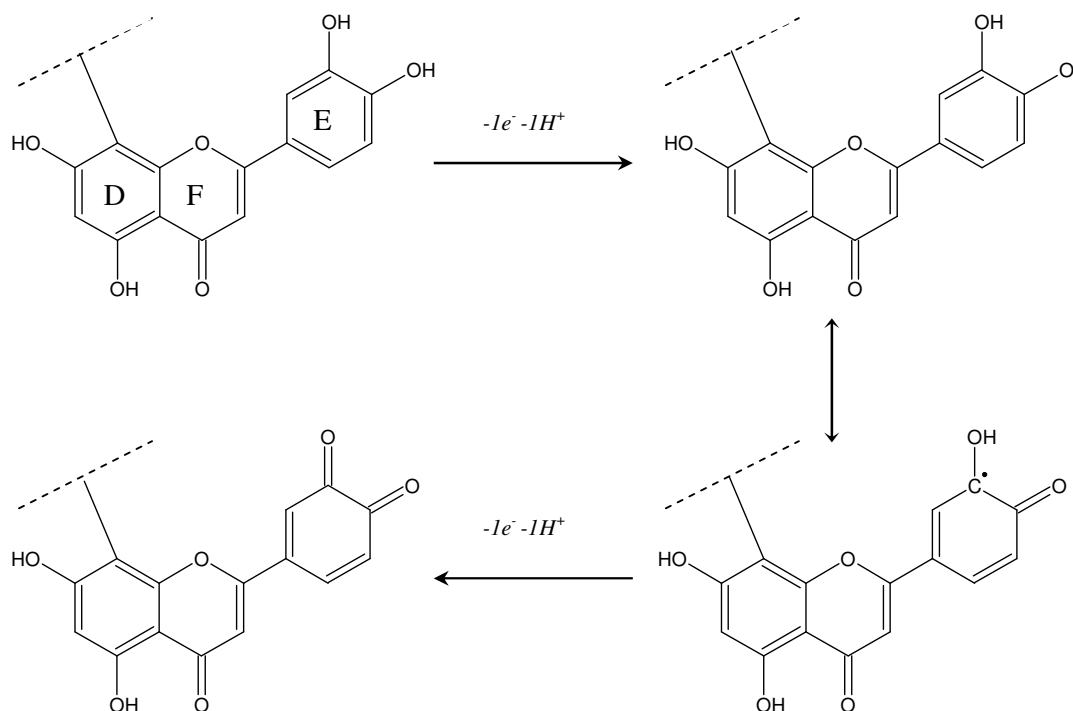


Figura 3. Mecanismo de terminación de radicales biflavonoides por pérdida de electrones de los grupos fenol y formación de *orto*-quinonas.

la información, utilizamos un parámetro adicional, el Índice de Reducción (Rit5') (Véase tabla 2). Este parámetro da una idea aproximada de la reactividad de cada compuesto o fracción en el proceso de la decoloración del radical libre DPPH'. Varios compuestos puros, así como la fracción FB, indujeron un marcado descenso en la concentración de DPPH' cuando fueron comparados con la reactividad de [Q]. Las especies más reactivas fueron la fracción FB y el compuesto morelloflavona [1], los cuales presentaron valores de Rit5' similares (0,84–0,86). La amentoflavona mostró la menor reactividad, significativamente diferente a la de cualquier otro compuesto estudiado.

Inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

Se ha evaluado también la inhibición de la peroxidación lipídica, utilizando la formación de malondialdehído (MDA) como índice de la oxidación de LDL, después de la oxidación con CuSO₄. La peroxidación lipídica se llevó a cabo en presencia de la fracción biflavonoide (FB) y de los biflavonoides aislados a partir de ella. En la tabla 2 aparece la protección conferida por las sustancias evaluadas y se observa que la fracción FB reduce la peroxidación en forma dependiente de la dosis, demostrando ser un antioxidante efectivo. El valor de CE₅₀ determinado para el efecto inhibitorio de FB en la peroxidación lipídica fue de 11,85 µg/mL, el más bajo observado entre las sustancias evaluadas. Los biflavonoides puros morelloflavona [1] y volkensiflavona [2], también presentaron actividad antioxidante con unos valores de CE₅₀ de 12,36 y 20,57 µg/mL respectivamente. La menor actividad se observó para el biflavonoide amentoflavona [3] (CE₅₀ de 91,34 µg/mL). En este ensayo, la quercetina [Q] se utilizó como control positivo, mostrando una actividad de 25,06 µg/mL. El biflavonoide [1] es el responsable de la mayor parte de la actividad captadora de DPPH' y de la protección contra la peroxidación lipídica de la FB, aunque es posible un proceso de sinergismo, ya que, a pesar de que la FB contenía biflavonoides de baja actividad relativa como [3], su CE₅₀ en algunos casos fue superior a la obtenida para el compuesto [1] puro. En este sentido, diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante en combinación que de forma aislada. Así, los polifenoles aislados, como el galato de epigallocatequina,

la quercetina, el diosmetin y el pignogenol, ejercen una protección parcial ante la peroxidación lipídica; en cambio, la combinación de todos ellos aumenta muchísimo el efecto protector (36).

CONCLUSIONES

Se llevó a cabo un estudio fitoquímico con una fracción biflavonoide obtenida a partir de *G. madruno*, identificando el biflavonoide de tipo flavona-(3'→8'')-flavona amentoflavona y los compuestos de tipo flavanona-(3→8'')-flavona: morelloflavona y volkensiflavona. Estos últimos presentan, como característica, un fenómeno de atropisomerismo, con la presencia de conformeros que difieren en la rotación alrededor del enlace inter-flavonoide C3→C8''. Las observaciones sugieren que dicho fenómeno varía con la temperatura pero no con los solventes, de manera que estos últimos no tienen efecto significativo en el comportamiento rotamérico de los compuestos.

Igualmente, se estudió la actividad antioxidante de la fracción FB y de los compuestos aislados a partir de ella, por medio de los métodos del 2,2'-difenil-1-picrilhidracil (DPPH') y de la inhibición de la peroxidación de las LDL. En general, los compuestos con enlace inter-flavonoide C3→C8'' demuestran una potente actividad captadora de radicales DPPH'. Los biflavonoides que presentan esta característica en combinación con una sustitución 3'',4''-dihidroxi (catecol) en el anillo E, un doble enlace entre C-2'' y C-3'' y una función carbonilo en posición C-4'', son los captadores de radicales más activos. En relación con los inhibidores de la peroxidación de LDL, los mejores inhibidores fueron los compuestos con enlace inter-flavonoide C3→C8'': morelloflavona y volkensiflavona. Los datos sugieren que la FB es una excelente candidata para ser utilizada como antioxidante. Es probable que se produzcan procesos de sinergismo en la FB, toda vez que presenta una actividad captadora de radicales y una inhibición de la peroxidación de LDL superior, en algunos casos, a los compuestos más activos.

AGRADECIMIENTOS

El autor principal agradece a la Universidad de Antioquia y a la Fundación Carolina, la concesión de una beca predoctoral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- González ML, Muñoz-Rodríguez P, Valls-Bellés V. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información: Cerveza y salud. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.nutricion.org/publicaciones/pdf/libro_cerveza_8.pdf. Consultado: 12 de septiembre de 2009.
- Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37 (12): 1921-1942.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000; 408 (6809): 239-247.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 2002; 7 (9): 05-410.
- Aruoma OI. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat Res*. 2003; 523-524 (1): 9-20.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*. 1996; 16 (1): 33-50.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*. 2006; 99 (1): 191-203.
- Rice-Evans BKR. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes. En: Press P, editores. *Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*. 7 ed. Londres: Ashgate; 1995. p.184.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res*. 2005; 579 (1-2): 200-213.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*. 1997; 349 (9053): 699.
- Chisolm GM, Hazen SL, Fox PL, Cathcart MK. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. *Biochem Biol Mech*. 1999; 274 (37): 25959-25962.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002; 13 (10): 572-584.
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Med*. 1999; 65 (5): 465-467.
- Yamaguchi LF, Vassão DG, Kato MJ, di Mascio P. Biflavonoids from brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry*. 2005; 66 (18): 2238-2247.
- Chen J, Chang HW, Kim HP, Park H. Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavonoids. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16 (9): 2373-2375.
- Li XC, Joshi AS, Tan B, Elsohly HN, Walker LA, Zjawiony JK, Ferreira D. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3-->8'')-flavone biflavonoids from *Rhedia acuminata*. *Tetrahedron*. 2002; 58 (43): 8709-8717.
- Masuda T, Yamashita D, Takeda Y, Yonemori S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of Seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005; 69 (1): 197-201.
- Markham KR, Sheppard C, Geiger H. ¹³C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. *Phytochemistry*. 1987; 26 (12): 3335-3337.
- Fonseca FN, Ferreira AJS, Sartorelli P, Lopes NP, Floh EIS, Handro W, Kato MJ. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*. 2000; 55 (6): 575-580.
- Herbin GA, Jackson B, Locksley HD, Scheinmann F, Wolstenholme WA. The biflavonoids of *Garcinia volkensii* (Guttiferae). *Phytochemistry*. 1970; 9 (1): 221-226.
- Chari VM, Ilyas M, Wagner H, Neszmélyi A, Fa-Ching C, Li-Kuang C, Yu-Chin L, Yu-MeeI L. ¹³C-NMR spectroscopy of biflavanoids. *Phytochemistry*. 1977; 16 (8): 1273-1278.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995; 28 (1): 25-30.
- Motulsky HJC. A Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting. San Diego CA: Oxford University Press; 2003. p. 257.
- Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chem*. 2005; 90 (1-2): 157-167.
- Rojstaczer N, Triggle DJ. Structure-function relationships of calcium antagonists: Effect on oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochem Pharmacol*. 1996; 51 (2): 141-150.
- Han QB, Lee SF, Qiao CF, He ZD, Song JZ, Sun HD, Xu HX. Complete NMR assignments of the antibacterial biflavonoid GB1 from *Garcinia kola*. *Chem Pharm Bull*. 2005; 53 (8): 1034-1036.
- Baggett S, Protiva P, Mazzola EP, Yang H, Ressler ET, Basile MJ, Weinstein IB, Kennelly EJ. Bioactive Benzophenones from *Garcinia anthochymus* Fruits. *J Nat Prod*. 2005; 68 (3): 354-360.
- Kang SS, Lee JY, Choi YK, Song SS, Kim JS, Jeon SJ, Han YN, Son KH, Han BH. Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005; 15 (15): 3588-3591.
- Furuno K, Akasako T, Sugihara N. The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25 (1): 19-23.
- Rice-Evans C, Leake D, Bruckdorfer KR, Diplock AT. Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls. *Free Radic Res*. 1996; 25 (4): 285-311.
- Seyoum A, Asres K, El-Fiky FK. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*. 2006; 67 (18): 2058-2070.
- Amić D, Davidović-Amić D, Bešlo D, Trinajstić N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat Chem Acta*. 2003; 76 (1): 55-61.
- Dugas AJ, Castañeda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. *J Nat Prod*. 2000; 63 (3): 327-331.
- Sekher Pannala A, Chan TS, O'brien PJ, Rice-Evans CA. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282 (5): 1161-1168.
- Lebeau J, Furman C, Bernier JL, Duriez P, Teissier E, Cotellet N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29 (9): 900-912.
- Ueda T, Ueda T, Armstrong D. Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in mammalian eye. *Ophthalmic Res*. 1996; 28 (3): 184-192.