

20. Productos Naturales Bioactivos y sus aplicaciones

Análisis de una fracción bioactiva a partir de hojas de *Maytenus ilicifolia* por LC-ESI-IT-MSⁿ

Escobal, Micaela^a; micaela.escobal@cut.edu.uy ; De Souza, Guillermo^a; Orientadora:
Olivaro, Cristina^a; cristina.olivaro@cut.edu.uy

a) Universidad de la República, Centro Universitario de Tacuarembó, Espacio de Ciencia y Tecnología Química, Ruta 5 Km 386,5, 45000

Resumen

Maytenus ilicifolia es una planta medicinal ampliamente distribuida en Uruguay. Una fracción purificada a partir de extracto etanólico de hojas presenta actividad antiparasitaria contra nematodos gastrointestinales de bovinos. El objetivo del presente trabajo es realizar una caracterización estructural preliminar de dicha fracción mediante LC-ESI-IT-MSⁿ.

El extracto fue sometido a fraccionamiento bioguiado mediante VLC y C₁₈ SPE. Se realizó la actividad antiparasitaria por el ensayo de eclosión de huevos. La fracción bioactiva se investigó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray en modo negativo y trampa de iones lineal como analizador.

La fracción purificada del extracto etanólico fue adecuadamente separada por cromatografía y el espectrómetro de masas fue seteado para monitorear, seleccionar y fragmentar los iones [M-H]⁻ más abundantes en el rango *m/z* 200-1500. De acuerdo a sus iones [M-H]⁻, iones producto característicos y tiempos de retención, varios constituyentes fueron identificados. Se encontraron catequina y epicatequina; glicósidos flavonoides principalmente con quercetina y kaempferol como agliconas; taninos compuestos por catequina/epicatequina y afzelequina/epiafzelequina.

LC-ESI-IT-MSⁿ es un método rápido y fácil que puede transferirse a otras fracciones purificadas bioactivas, permitiendo una caracterización preliminar de sus principales compuestos.

Palabras clave: *Maytenus ilicifolia*, antiparasitarios, LC-ESI-IT-MSⁿ

Introducción

Maytenus ilicifolia es una importante planta medicinal, ampliamente distribuida en Uruguay, Paraguay, Argentina y Brasil. Se han reportado varias actividades biológicas para dicha especie (Souza et al, 1991; Leite et al, 2001; Jorge et al, 2004; Duarte y Debur, 2005; Capriani et al, 2006; Souza et al, 2008^a; Santos-Olivera et al, 2009). Muchos metabolitos secundarios con potenciales actividades biológicas están presentes en extractos de *Maytenus* spp., incluyendo flavonoides, triterpenos y sesquiterpenos (Souza et al, 2008^b).

Los flavonoides son importantes constituyentes de las plantas, encontrándose en hojas, frutos y raíces. Están formados por 2 anillos bencénicos (A y B), conectados mediante un anillo heterocíclico C que puede ser pirano o pirona (si tiene un doble enlace en la posición 4). Presentan por lo tanto un esqueleto carbonado 6-3-6. Basados en la saturación y oxidación del anillo heterociclo C, los flavonoides se subdividen en: 1) hidroxiflavonoides, presentan un grupo hidroxilo en C-3 del anillo C, e incluyen flavonoles, catequinas o flavan-3-oles, flavan-3,4-dioles y 2) 3-desoxyflavonoides, no presentan el grupo hidroxilo en C-3, e incluyen flavanonas y flavonas. Los flavonoides bien conocidos, pertenecientes a la clase flavan-3-oles, incluyen catequina (*trans*) y epicatequina (*cis*), los cuales difieren en la configuración

del C-2 y C-3, y están sustituidos por al anillo catecol (B) y el grupo hidroxilo, respectivamente. Otros flavonoides estructuralmente relacionados a los anteriores son afezequina y epiafezequina (Fig. 1). Estos compuestos forman oligómeros entre ellos, dando lugar a proantocianidinas, conocidas como taninos condensados.

Las infecciones por nematodos gastro-intestinales en ovinos y bovinos causan gran preocupación, generando problemas importantes a nivel sanitario y económico

para la ganadería en todo el mundo. El uso incorrecto y continuo de las drogas antihelmínticas ha conducido al desarrollo de resistencia a nivel mundial y Uruguay no es la excepción (Coles et al, 1992). En este contexto, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias para el control de la parasitosis. Una de ellas lo constituye el uso de metabolitos secundarios de las plantas, con el objetivo no solo de encontrar nuevas moléculas con actividad antihelmíntica, sino que también por su aplicabilidad como suplemento en raciones, usando extractos o el material vegetal tal cual.

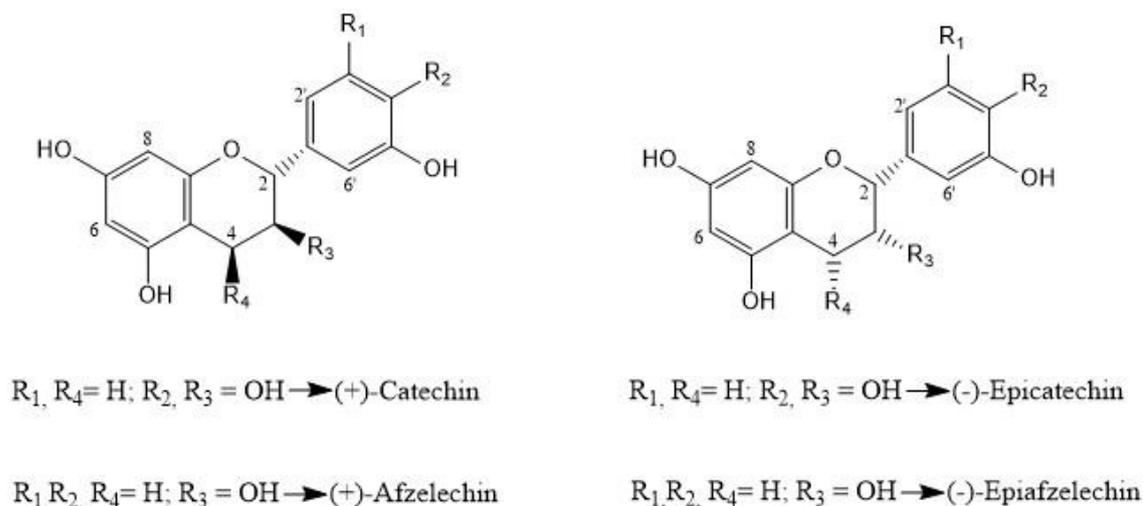


Figura 1. Estructuras representativas de flavan-3-oles.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es realizar una caracterización preliminar de una fracción purificada bioactiva a partir de hojas de *Maytenus ilicifolia* mediante LC-ESI-IT-MSⁿ.

Materiales y Métodos

Reactivos y materiales

Se utilizaron ácido fórmico y acetonitrilo grado HPLC de J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El agua destilada fue purificada usando un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MS, USA). Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) utilizados fueron Hypersep® C-18 500 mg de Thermo Scientific (USA). Se realizó cromatografía en capa fina (TLC) con placas de silica gel 60, F₂₅₄, 0.2 mm de Merck (Darmstadt, Alemania).

Instrumentación general

Los análisis de LC-ESI-IT-MS² se realizaron en un equipo Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) systems (Dionex, Germering, Alemania), equipado con un desgaseador, bomba binaria de alta presión y autosampler acoplado a un espectrómetro de masas con trampa lineal como analizador LTQ XL de Thermo Scientific (San José, CA, USA) y con ESI como interfase. El control del instrumento y la adquisición de datos fue realizado usando el software Xcalibur (v3.0.63).

Material vegetal y preparación de la fracción bioactiva

Las hojas de *M.ilicifolia* se colectaron en Julio de 2016 en la región norte de Uruguay, en el departamento de Tacuarembó.

El material vegetal fresco fue secado a 40°C en estufa durante 48 horas y posteriormente fue molido. Al material molido y seco (50 g) se le realizó una extracción con etanol (200 ml) por maceración durante 24 horas, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de la filtración y de la evaporación a vacío una porción del residuo obtenido fue sometido a cromatografía al vacío (VLC) usando silica gel 40 (0.2-0.5 mm, Merck, Darmstad). El extracto fue separado en 10 fracciones usando como fase móvil diferentes mezclas de solventes (CH₂Cl₂, CH₃OH, H₂O) de forma de ir aumentando la polaridad. Las fracciones fueron analizadas usando TLC con CH₂Cl₂:CH₃OH (80:20 v/v) como fase móvil, detección con lámpara UV a 254 nm y anisaldehído como reactivo revelador seguido de calentamiento (Wagner, 1996). Se juntaron las fracciones desde la 5 a la 7 y se rotaevaporaron (F₅₋₇). Luego se retomaron en agua con ácido fórmico al 0.1%, se centrifugó y una alícuota del sobrenadante fue sometido a purificación mediante SPE. La fracción purificada obtenida fue ensayada mediante el ensayo de eclosión de huevos y analizada por LC-ESI-IT-MSⁿ.

Determinación *in vitro* de la actividad antiparasitaria

Se realiza mediante el ensayo de eclosión de huevos (egg hatching assay) realizado de acuerdo a las guías WAAVP (Coles et al,1992). Los huevos usados fueron

colectados de las heces de bovinos de la región norte de Uruguay (Tacuarembó) infectados naturalmente.

LC-ESI-IT-MSⁿ

La separación cromatográfica fue realizada en una columna Hypersil Gold RP C18 (50 mm x 2.1 mm ID, 1.9 μm) de Thermo Scientific (USA). Una alícuota de 10 μl de la fracción purificada fue inyectada en el Sistema UHPLC-MS. La fase móvil consistió en un gradiente de agua y acetonitrilo, ambos con 0.1% de ácido fórmico. Las condiciones iniciales fueron 5% acetonitrilo alcanzando hasta 95 % de acetonitrilo en 25 minutos, luego se mantuvo en esa composición por 5 minutos. En los siguientes 12 minutos se retornó a las condiciones iniciales. El flujo de trabajo fue de 0.25 ml/min y la columna se mantuvo a 35°C. El LTQ XL fue operado en modo negativo escaneando en el rango de *m/z* 200-1500 y se programó un método data-dependent MS² para lograr la completa identificación de los metabolitos. Los parámetros de ESI, que fueron optimizados en la fracción purificada, se detallan a continuación: voltaje del capilar -45 V, voltaje tube lens offset -245 V, flujo sheath gas (nitrógeno) 20 (unidades arbitradas, a.u.), flujo de gas auxiliar (nitrógeno) 20 a.u., temperatura del capilar 300 °C. La energía de colisión usada fue de 35 %.

Resultados y Discusión

La fracción purificada, mediante VLC y

SPE, del extracto etanólico de hojas de *Maytenus ilicifolia*, fue estudiada por LC-ESI-IT-MS² en modo negativo. En este modo sólo se observaron iones monocargados, todos deficientes en un protón [M-H]⁻.

Los compuestos de dicha fracción fueron adecuadamente separados por cromatografía en fase reversa usando una columna UHPLC y como fase móvil un gradiente de acetonitrilo y agua en condiciones ácidas. El espectrómetro de masas fue seteado para monitorear,

seleccionar y fragmentar los iones [M-H]⁻ más abundantes en el rango de masas de *m/z* 200-1500. La energía de colisión fue seteada de tal manera que produzca abundantes iones producto, para así lograr información estructural adecuada. Los valores de *m/z* de los iones [M-H]⁻ y sus tiempos de retención son listados en la Tabla 1. Diecisiete compuestos fueron tentativamente identificados de acuerdo a sus espectros de masas, tiempos de retención y comparación con la literatura.

Tabla 1.

Datos cromatográficos y espectrales obtenidos de la fracción bioactiva purificada por VLC y SPE de Maytenus ilicifolia mediante análisis LC-ESI-IT-MS²

N°	t _R (min)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	Principales Fragmentos (<i>m/z</i>)	Identificación
1	2.95	289	271, 245, 231, 205, 179, 165, 137, 109	Catequina
2	4.10	289	271, 245, 231, 205, 179, 165, 137, 109	Epicatequina
3	5.70	463	301, 271, 255, 179, 151	Hiperósido/Isoquercitrina (Quercetina-hexósido)
4	3.50	561	543, 435, 407, 289, 271, 245	(E)Afz-(E)Cat
5	4.50	561	543, 435, 407, 289, 271, 245	(E)Afz-(E)Cat
6	6.50	561	543, 435, 407, 289, 271, 245	(E)Afz-(E)Cat
7	2.27	577	451, 425, 407, 289, 245, 161	(E)Cat-(E)Cat
8	3.70	577	451, 425, 407, 289, 245, 161	(E)Cat-(E)Cat
9	5.50	609	301, 289	Quercetina-desoxihexosil- hexósido

10	4.30	833	815, 707, 561, 543, 289, 271	(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat
11	4.70	833	815, 707, 561, 543, 289, 271	(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat
12	6.90	833	815, 707, 561, 543, 289, 271	(E)Afz-(E)Afz-(E)Cat
13	4.80	847	575, 289	(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat
14	3.60	849	577, 289	(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat
15	4.40	849	577, 289	(E)Afz-(E)Cat-(E)Cat
16	5.30	871	285, 447, 593, 739, 725	Ara-Rha-Rha-Hex-Kaemp
17	4.90	887	301, 463, 609, 741, 755	Ara-Rha-Rha-Hex-Quer

(E) Afz: afzelequina o epiafzelequina; (E) Cat: catequina o epicatequina; Kaemp: kaempferol; Quer: quercetina.

Catequina y epicatequina desprotonadas aparecen a m/z 289 [M-H]⁻, presentan el mismo espectro MS² y logran resolverse adecuadamente por el método cromato-gráfico usado. Catequina presenta un tiempo de retención de 2.95 minutos y epicatequina de 4.10 minutos. Se identificaron glicósidos flavonoides con unidades de monosacáridos de 1 a 4, presentando principalmente quercetina y kaempferol como agliconas. El ion a m/z 463 [M-H]⁻ puede representar una mezcla de hiperósido e isoquercitrina, que son hexósidos de quercetina y el ion a m/z 609 [M-H]⁻ puede ser una mezcla de flavonoides-diglicósidos, tal como rutina u otro quercetina-desoxihexosil-hexósido. Flavonoides-triglicósidos fueron observados por infusión directa (DI-ESI-IT-MS¹) de la fracción formando iones negativos a m/z 739 y 755 [M-H]⁻. Cuando se estudió por LC-ESI-IT-MS² no alcanzó la sensibilidad para fragmentarlos y obtener sus espectros de masas (MS²), probablemente porque no eran abundantes o quizás porque coeluyeron con algún otro compuesto. Flavonoides-tetraglicósidos fueron identifi-cados a m/z 871 y 887 [M-H]⁻.

Los principales taninos encontrados están compuestos por catequina/epicatequina y por afzelequina/epiafzelequina, tal como se observa a m/z 561 y 577 [M-H]⁻, consistentes con dímeros, mientras que los iones a m/z 833, 847, 849 son consistentes con trímeros. Fue posible identificar varios de estos taninos isómeros.

Esta fracción purificada analizada por LC-ESI-IT-MSⁿ presentó actividad antiparasitaria *in vitro* contra nematodos gastro-intestinales de bovinos. La misma presenta una inhibición de la eclosión de huevos del 80 % a una concentración de 10 mg/ml.

Conclusiones

LC-ESI-IT-MSⁿ es un método rápido y fácil que puede transferirse a otras fracciones purificadas bioactivas, permitiendo una caracterización preliminar de sus principales compuestos. En este caso la estructura de los compuestos puede relacionarse con la actividad biológica.

Bibliografía

- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., Souza, L.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C., Gorin, P.A., Sasaki, G.L., Lacomini, M. (2006). A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. *Journal of Natural Products*, 69, 1018-21.
- Coles, G.C, Bauer, C., Borgsteede, S., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 44 (1-2), 35-44.
- Duarte, M.R. y Debur, M.C. (2005) Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. *Fitoterapia*, 76, 41-49.
- Jorge, R.M., Leite, J.P.V., Oliveira, A.B., Tagliati, C.A. (2004). Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Jornal Ethnopharmacol*, 94, 93-100.
- Leite, J.P.V., Rastrelli, L., Romussi, G., Oliveira, A.B., Vilegas, J.H.Y., Vilegas, W., Pizza, C. (2001). Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (8), 3796-3801.
- Santos-Oliveira, R., Coulaud-Cunha, S., Colaço, W. (2009). Review of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribution to the studies of pharmacological properties. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19, 650-659.
- Souza, L.M., Cipriani, T.R., Serrato, R.V., Costa, D.E., Lacomini, M., Gorin, P.A.J., Sasaki, G.L. (2008^a). Analysis of flavonol glycoside isomers from leaves of *Maytenus ilicifolia* by offline and online high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1207 (1-2), 101-109.
- Souza, M.L., Oliveira, M.G., Monteiro, M.G., Gomes, S., Braz, S., Carlini, E.A. (1991). Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 34 (1), 21-27.
- Souza, L.M. Cipriani, T.R.; Lacomini, M., Gorin, P.A.J., Sasaki, G.L. (2008^b). HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannis in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 59-67.

Wagner, H. y Bladt, S. (1996). Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. München, Germany. Springer.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. América Mederos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de Tacuarembó por la realización de los ensayos *in vitro* de actividad antiparasitaria.