

Variación de los perfiles de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae), su estudio mediante electroforesis capilar y su relación con la actividad farmacológica.

Cecilia B. Dobrecky

Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacobotánica y Cátedra de Tecnología Farmacéutica I. Junín 956, Buenos Aires, Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: lcdobrec@ffyb.uba.ar

Compendio de tesis

Lugar y fecha de aprobación de la tesis: Museo de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Fecha: 1 de marzo de 2016.

Resumen

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. —Loranthaceae— es una especie hemiparásita que se desarrolla sobre diferentes hospedantes. Es conocida con el nombre vulgar de “liga” o “liguilla”. Debido a su similitud morfológica, constituye el sustituto natural del “muérdago europeo”, por lo cual es denominado “muérdago criollo”. Las drogas vegetales son matrices complejas en las cuales múltiples componentes actúan en forma sinérgica y son responsables de la acción farmacológica. Con el fin de dar sustento científico al uso folclórico de *L. cuneifolia* se estudiaron distintas formas de obtención de los extractos, se evaluaron diferentes hospedantes y regiones fitogeográficas. Se desarrolló y validó un método de electroforesis capilar para construir *fingerprints* o perfiles cromatográficos característicos que permitan evaluar los distintos componentes con el fin de estandarizar los extractos. Se efectuó la comparación con otras técnicas cromatográficas, tales como en cromatografía en capa delgada (TLC) y líquida de alta resolución (HPLC). A su vez, se procedió al aislamiento, purificación y análisis estructural de los compuestos de interés por técnicas espectroscópicas y cromatográficas. Se identificaron diez compuestos, de los cuales cuatro son reportados por primera vez en esta especie. La electroforesis capilar probó ser una técnica adecuada para el control de calidad de los extractos y una alternativa atractiva a las técnicas cromatográficas tradicionales.

Polyphenolic profile variation in *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae), capillary electrophoretic analysis and its relationship with the pharmacological activity

Summary

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. —Loranthaceae— is a hemiparasite plant which grows on different host trees. It is popularly referred to as “liga” or “liguilla”. Due to its morphological similarity, it is considered as the natural substitute for the European mistletoe, for which is known as the “Argentine mistletoe”. Herbal drugs are complex matrices in which multiple components acting synergistically are responsible for the pharmacological activity. In order to provide scientific support to the popular use of *L. cuneifolia*, a capillary electrophoretic method was developed and validated to build a chromatographic profile or fingerprint that allows the evaluation of different components for extract standardization. A comparison was made with other chromatographic techniques such as TLC and HPLC. Isolation, purification and structural analysis of compounds were performed by chromatographic and spectroscopic methods. Ten analytes were identified, four of which are reported for the first time in *L. cuneifolia*. Capillary electrophoresis proved to be an appropriate tool for the quality control of herbal drugs, as well as an attractive alternative to traditional chromatographic techniques.

Palabras clave: *Ligaria cuneifolia* - flavonoides - electroforesis capilar.

Key words: *Ligaria cuneifolia* - flavonoids - capillary electrophoresis.

Introducción

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae) es una especie hemiparásita vulgarmente conocida con el nombre de “muérdago criollo”, “liga” o “liguilla”. Es una especie sudamericana que se encuentra en Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Brasil y Uruguay. En la Argentina presenta una gran dispersión; se extiende desde Salta y Jujuy, en el Norte, hasta La Pampa en el Sur, y desde Entre Ríos y al noreste de Buenos Aires hasta la precordillera andina (Varela y col., 2001).

Son plantas hemiparásitas que se desarrollan sobre vástagos leñosos, dependen del hospedante para vivir, de donde obtienen el agua y los nutrientes minerales; son organismos fotosintetizadores ya que producen sus propios carbohidratos.

Por su condición de hemiparásitas, en general están desprovistas de raíces; al germinar la semilla da lugar a un disco de adhesión en el hipocótilo que le permite aferrarse a la superficie de las ramas y de los tallos del hospedante. Luego generan un cono de penetración que crece entre los tejidos hasta llegar al xilema por donde circulan el agua y las sales (Abbiatti, 1946; Becker, 1986; Luther y col., 1987).

Esta especie es utilizada popularmente como agente hipotensor y, debido a su similitud morfológica, constituye el sustituto natural del “muérdago europeo” (*Viscum album* L. –Santalaceae–). *L. cuneifolia*, al igual que las otras especies de la familia Loranthaceae, son ricas en flavonoides, especialmente flavonoles, compuestos que podrían ser determinantes de su acción biológica.

Los flavonoles reportados en *L. cuneifolia* corresponden a derivados glicosilados de quercetina mientras que las proantocianidinas se encuentran representadas fundamentalmente, por la catequina y sus derivados poliméricos.

Tradicionalmente, la determinación del perfil de polifenoles se ha realizado por HPLC acoplado a distintos detectores. Sin embargo, la electroforesis capilar se ha posicionado como una metodología atractiva dada su gran versatilidad y el mínimo consumo de muestra y solventes utilizados, por lo cual no sólo es una opción más económica, sino que representa la alternativa “verde” a las técnicas cromatográficas convencionales. En este sentido, resulta adecuada para un sinnúmero de aplicaciones, entre ellas, la construcción de *fingerprints* característicos, el control de calidad de los extractos y la comparación de perfiles correspondientes a ejemplares de distinto estado fenológico y zonas fitogeográficas, entre otras.

Por lo anteriormente mencionado, resulta indispensable proceder a la caracterización de los extractos de *L. cuneifolia* a fin de determinar el *fingerprint* de los polifenoles y dar sustento científico al uso folclórico de esta especie (Dobrecky, 2016).

Objetivos

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos generales

- Proceder al aislamiento, la identificación y la caracterización de los flavonoides presentes en *L. cuneifolia*.
- Estudiar la variación en el perfil de los flavonoides mediante la electroforesis capilar.

Objetivos específicos

- Efectuar la dilucidación estructural de los compuestos presentes en la fracción acetato de etilo, mediante la aplicación de cromatografía líquida acoplada a masa con posterior fragmentación de los iones moleculares de interés y RMN.
- Realizar un estudio poblacional, mediante el análisis de la variación en los perfiles de los flavonoides de la fracción acetato de etilo de acuerdo con la parte estudiada y el hospedante, por medio de distintas técnicas cromatográficas.
- Desarrollar una metodología analítica por electroforesis capilar para el estudio de los flavonoides presentes en la fracción acetato de etilo.
- Comparar los perfiles obtenidos con el método por HPLC.
- Desarrollar un método de control de calidad, mediante la construcción de *fingerprints* característicos (perfiles cromatográficos que sirven como marcas de reconocimiento específico).

Desarrollo experimental

La recolección de los ejemplares de *L. cuneifolia* se realizó en la localidad de Barreal, departamento de Calingasta, provincia de San Juan (1478 ms.n.m. 31° 28' S - 69° 25' O).

Los hospedantes fueron *Prosopis flexuosa* D.C., *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz emend. Burkart (Leguminosae) y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (Leguminosae). Sobre estos ejemplares se realizaron los principales ensayos de aislamiento, identificación y caracterización de los flavonoides. También se trabajó con una muestra comercial de la provincia de San Juan.

A fines comparativos, se efectuó una recolección de ejemplares en la provincia de Catamarca en la localidad de Puerta de San José, Departamento de Belén (1450 ms.n.m. 27° 33' S - 67° 01' O). Los hospedantes analizados fueron *Olea europea* L. (Oleaceae) (“olivo”), *Bulnesia retama* (Gillies ex Hook. & Arn.) Griseb. (Zygophyllaceae) (“retamo”) y leguminosas tales como *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz (“algarrobo”), y *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook. & Arn.) Burkart (“chañar”).

Tabla 1.- Esquema de trabajo para la obtención de los diferentes extractos

Región	San Juan					Catamarca				
Muestra	Muestra comercial	Material colectado					Material colectado			
Hospedante	-	<i>Prosopis y Geoffroea</i>					Chañar	Algarrobo	Olivo	Retama
Parte usada	Hoja	Hoja			Tallo		Planta entera			
Extracto	MeOH 100 %	MeOH comb.	MeOH 100 %	MeOH 80 %	MeOH 50 %	MeOH comb	MeOH 100 %	MeOH 100 %	MeOH 100 %	MeOH 100 %
Fracción		AE	AE	AE	AE	AE				

El muestreo fue representativo de las áreas de distribución natural, durante las épocas de floración y posfloración (entre octubre y noviembre), en estadios fenológicos específicos. Se recolectó material silvestre y una muestra comercial de la provincia de San Juan. Las partes analizadas incluyeron hojas y tallos herbáceos. En el caso de las muestras de Catamarca, se utilizó la planta entera.

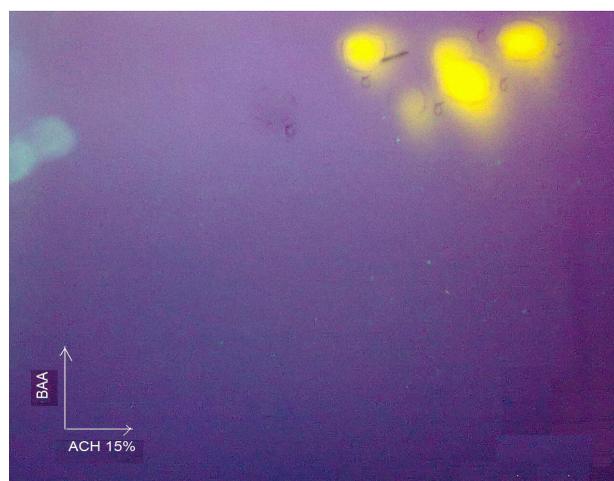
Se evaluaron distintos procedimientos de extracción del material vegetal. Se tomó una muestra representativa debidamente desecada y molida de hojas y tallos herbáceos o de la planta entera, según el caso. Se realizó una limpieza del material para eliminar grasas y clorofilas con hexano y diclorometano. Posteriormente, el material fue sometido a extracciones sucesivas con mezclas de metanol-agua (100, 80 y 50 %), de manera de asegurar el agotamiento del material. El solvente orgánico fue eliminado mediante el evaporador rotatorio y las fracciones acuosas se reunieron para realizar particiones ulteriores con acetato de etilo y

butanol. Al finalizar el procedimiento se obtuvieron entonces 3 fracciones: acetato de etilo, butanólica y acuosa.

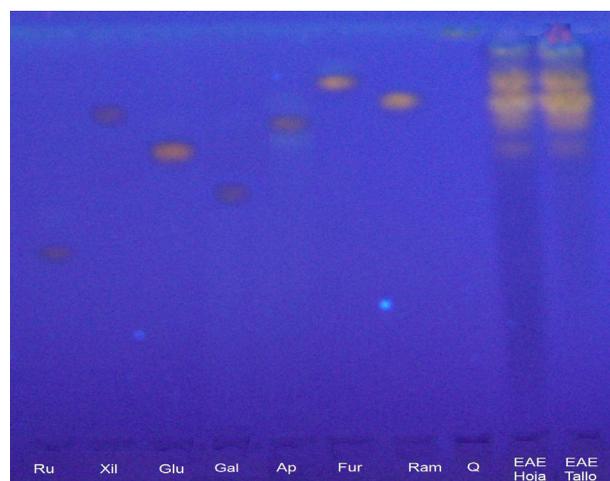
En los 3 casos se procedió a eliminar el solvente orgánico mediante evaporador rotatorio y el residuo obtenido se pesó y se conservó en recipiente adecuado y a 4 °C para futuros ensayos. Los estudios que a continuación se detallan, se centrarán sobre la fracción acetato de etilo.

A efectos comparativos en lo referente al perfil de flavonoides, también se analizaron las fracciones acetato de etilo individuales obtenidas a partir de metanol puro y de las mezclas MeOH-agua 80 % y 50 %, respectivamente (Tabla 1).

Luego de la obtención de las distintas fracciones, se procedió a la determinación del contenido de polifenoles por espectroscopía UV (Dobrecky, 2016). Para todas las determinaciones se observa que los mayores valores corresponden a la fracción acetato de etilo obtenida a partir de los ejemplares de San Juan, que representa una porción enriquecida en polifenoles y, especialmente, flavonoides.

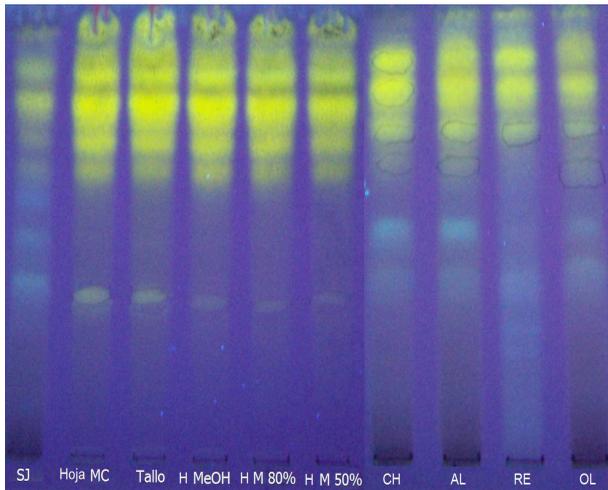
Figura 1.- Cromatografía bidimensional de la fracción acetato de etilo de San Juan

Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300. **Fase móvil:** butanol-AcH-agua (6:1:2) (primera dimensión); AcH 15 % (segunda dimensión). **Detección:** UV 254 y 366 nm. **Revelador:** NP y visualización UV 366 nm.

Figura 2.- Cromatograma unidireccional de la fracción "MeOH combinado AE"

Fase estacionaria: sílica gel 60 F254. **Fase móvil:** acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26). **Testigos:** Ru, rutina; Xil, quercetina-3-O-xilósido; Glu, quercetina-3-O-glucósido; Ap, quercetina-3-O-arabinopiranosido; Fur, quercetina-3-O-arabinofuranósido; Ram (quercetina-3-O-ramnósido; Q, quercetina. **Detección:** UV 254 y 366 nm. **Revelador:** NP y visualización UV 366 nm.

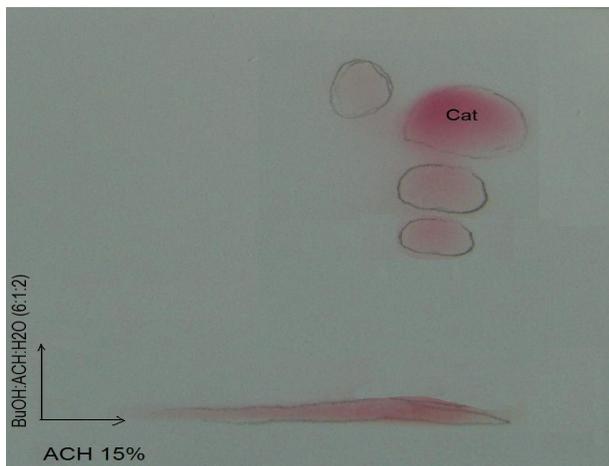
Figura 3.- Estudio comparativo de las muestras de San Juan y Catamarca



Muestras San Juan (calles 1 a 6). **SJ:** muestra comercial de San Juan; **Hoja MC:** hoja metanol combinado; **Tallo:** tallo metanol combinado; **H MeOH:** hoja metanol; **H M 80 %:** hoja metanol 80 %; **H M 50 %:** hoja metanol 50 %. Muestras de Catamarca (calles 7 a 10). Extractos metanólicos de distintos hospedantes. **CH:** chañar; **AL:** algarrobo; **RE:** retama; **OL:** olivo.

Dentro de este grupo, los valores más altos se corresponden con la fracción acetato de etilo obtenida a partir de las extracciones sucesivas con metanol y combinaciones de metanol-agua, que permiten un agotamiento eficiente del material vegetal. Además, la hoja presenta mayor contenido de polifenoles. En cuanto a las muestras de Catamarca, la mayor variabilidad se presenta en los ejemplares que se desarrollan sobre "retama", para los cuales se obtienen valores significativamente disminuidos de taninos condensados y totales y los más altos del grupo para flavonoides totales.

Figura 4.- Cromatograma bidimensional de la fracción "MeOH combinado-AE"



Fase estacionaria: celulosa Polygram Cel300. **Fase móvil:** butanol-ácido acético-agua (6:1:2) (primera dimensión) y ACH 15 % (segunda dimensión). **Muestras:** fracción "MeOH combinado AE". **Revelador:** vainillina/ácido clorhídrico.

También se analizaron los perfiles de polifenoles por cromatografía en capa delgada. Los distintos sistemas utilizados incluyeron cromatografías bidimensionales y unidireccionales en distintos soportes (principalmente, celulosa y sílica gel) y combinaciones de solventes. Estos permitieron evaluar la presencia de glicósidos de quercetina (Figuras 1-3) y de proantocianidinas (Figuras 4 y 5).

Uno de los objetivos principales del trabajo de tesis consistió en desarrollar y optimizar un método de electroforesis capilar que permitiera la construcción de *fingerprints* característicos de la especie.

Las condiciones del método optimizado fueron las siguientes (Dobrecky y col., 2017):

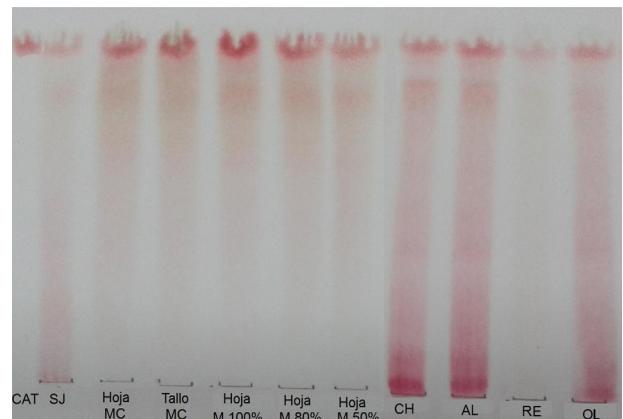
- Capilar: 60 cm (50 cm al detector) y 75 μ m de diámetro interno
- Voltaje: 20 kV
- Temperatura de corrida: 25 $^{\circ}$ C
- Temperatura del rack: 10 $^{\circ}$ C
- Inyección: hidrodinámica, 3 seg, 0,3 psi
- Detección: UV-DAD 255 y 280 nm
- BGE (electrolito): buffer borato 20 mM pH 8,3; SDS 50 mM; β -CD 5 mM; β -CD sulfatada 2 % P/V y MeOH 10 %
- Solución diluyente: buffer borato 20 mM pH 7 diluido 1/10 en agua

Se trabajó a dos longitudes de onda para la determinación de los glicósidos de flavonoles (255 nm) y los taninos condensados (280 nm) (Figuras 6 y 7).

En todos los métodos evaluados, fue posible detectar la presencia de cuatro compuestos desconocidos. A fin de determinar la identidad de estos, se procedió al aislamiento y purificación tales analitos, al análisis por espectroscopía de masa acoplada a HPLC y RMN.

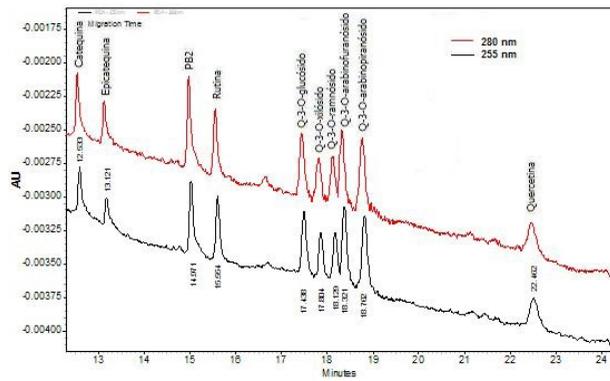
El análisis por HPLC-MS/MS (Q-TOF ESI-MS/MS)

Figura 5.- Cromatograma de las muestras estudiadas



CAT: catequina; **SJ:** San Juan comercial; **Hoja MC:** hoja metanol combinado; **Tallo MC:** tallo metanol combinado; **Hoja M 100 %:** hoja metanol 100 %; **Hoja M 80 %:** hoja metanol 80 %; **Hoja M 50 %:** Hoja metanol 50 %; **CH:** chañar; **AL:** algarrobo; **RE:** retama; **OL:** olivo. **Fase estacionaria:** sílica gel 60 F254. **Fase móvil:** acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:1:26). **Revelador:** vainillina/ácido clorhídrico.

Figura 6.- Solución mezcla de testigos (255 y 280 nm)

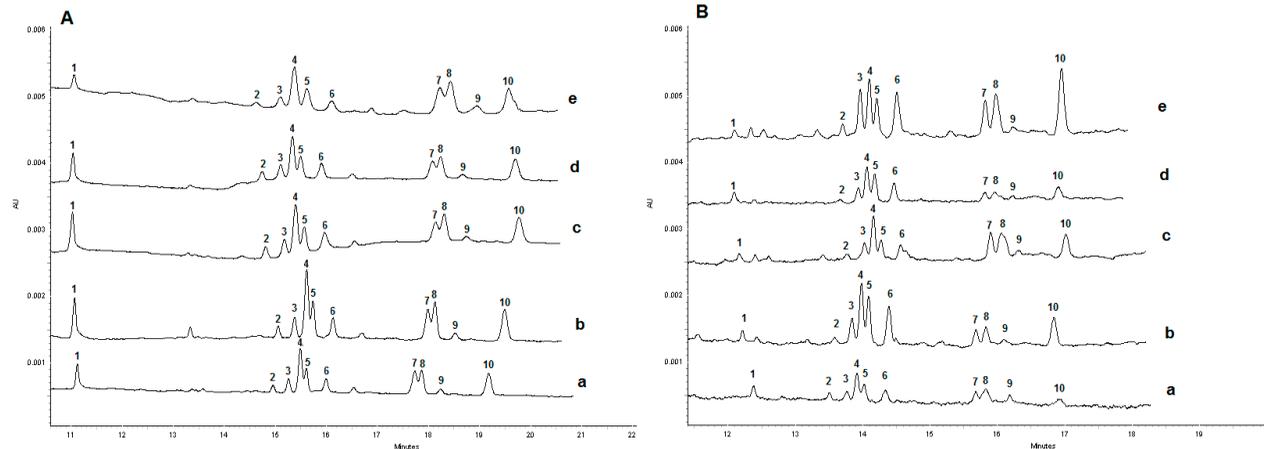


PBZ: procianidina Bz; **Q-3-O-glucósido:** quercetina-3-O-glucósido; **Q-3-O-xilósido:** quercetina-3-O-xilósido; **Q-3-O-ramnósido:** quercetina-3-O-ramnósido; **Q-3-O-arabinofuranósido:** quercetina-3-O-arabinofuranósido; **Q-3-O-arabinopiranósido:** quercetina-3-O-arabinopiranósido.

permitió comprobar la existencia de dos compuestos con $[M+H]^+601$ y otro par con $[M+H]^+587$. Luego de efectuar la fragmentación de estos iones moleculares, se detectó la presencia de un fragmento de m/z 303 consistente con la presencia de quercetina como aglicón y de un fragmento de m/z 153, correspondiente al ácido gálico. El resto de la molécula se compone de dos azúcares distintos: en el caso del ion molecular de 601, ramnosa y en el de 587, una pentosa (presumiblemente arabinofuranosa o arabinopiranos). Por otra parte, el análisis por RMN permitió determinar la estructura definitiva, en lo que refiere a la posición de los sustituyentes, el tipo de azúcar asociado y la presencia del ácido gálico (Dobrecky, 2016).

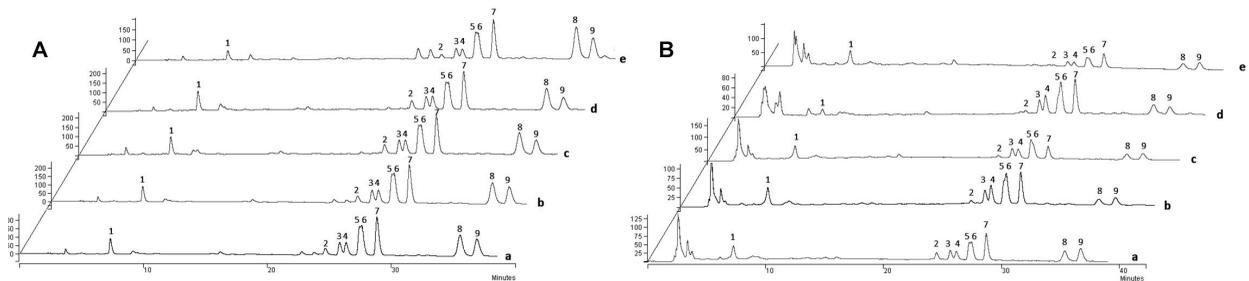
La combinación de todas las técnicas permitió la identificación de 4 compuestos que no habían sido previamente reportados en esta especie, a saber: quercetina-3-O-(2''-galoil) ramnósido, quercetina-3-O-(3''-galoil)

Figura 7.- Electroferogramas de los perfiles comparativos de las muestras de San Juan y Catamarca



A: fracción acetato de etilo de San Juan. **a-d:** hoja; **e:** tallo; **a:** extracto metanólico combinado; **b:** MeOH 100 %; **c:** MeOH 80 %; **d:** MeOH 50 %; **e:** extracto metanólico combinado. **B:** extractos metanólicos de Catamarca y muestra comercial de San Juan. **a:** muestra comercial; **b-e:** muestras de Catamarca sobre diferentes hospedantes; **b:** *Geoffroea decorticans*; **c:** *Olea europaea*; **d:** *Bulnesia retama*; **e:** *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa*. **1:** Catequina; **2:** Q-3-O-G; **3:** Q-3-O-X; **4:** Q-3-O-Rh; **5:** Q-3-O-AF; **6:** Q-3-O-AP; **7:** Q-3-O-(2''-galoil) ramnósido; **8:** Q-3-O-(3''-galoil) ramnósido; **9:** Q-3-O-(2''-galoil) arabinofuranósido; **10:** Q-3-O-(2''-galoil) arabinopiranósido.

Figura 8.- cromatograma de los perfiles comparativos de San Juan y Catamarca



A: fracción acetato de etilo de San Juan. **a-d:** hoja; **e:** tallo; **a:** extracto metanólico combinado; **b:** MeOH 100 %; **c:** MeOH 80 %; **d:** MeOH 50 %; **e:** extracto metanólico combinado. **B:** extractos metanólicos de Catamarca y muestra comercial de San Juan. **a:** muestra comercial; **b-e:** muestras de Catamarca sobre diferentes hospedantes; **b:** *Geoffroea decorticans*; **c:** *Olea europaea*; **d:** *Bulnesia retama*; **e:** *Prosopis chilensis* y *Prosopis flexuosa*. **1:** Catequina; **2:** Q-3-O-G; **3:** Q-3-O-X; **4:** Q-3-O-AP; **5:** Q-3-O-AF; **6:** Q-3-O-(2''-galoil) arabinopiranósido; **7:** Q-3-O-Rh; **8:** Q-3-O-(2''-galoil) ramnósido; **9:** Q-3-O-(3''-galoil) ramnósido.

ramnósido), quercetina-3-O-(2''-galoil) arabinofuranósido, quercetina-3-O-(2''-galoil) arabinopiranosido.

A efectos comparativos, se corrieron las muestras por HPLC. El método consistió en:

- Columna Luna Phenomenex C18 (2); 250 x 4,6 mm (5 µm)
- Flujo: 1,2 ml/min
- Temperatura: 40 °C
- Volumen de inyección: 20 µl
- Detección: UV-DAD 260 y 280 nm
- Fase móvil: AcH-Agua (2:98); AcH-MeOH (2:98) (Tabla 2)

El sistema no permitió detectar la quercetina-3-O-β-D-(2''-galoil)-arabinofuranósido, que probablemente coeluye con otro pico. Esto permitió comprobar la mayor selectividad del método de electroforesis capilar, que separó efectivamente todos los compuestos en estudio (Figura 8).

Conclusiones

Ligaria cuneifolia, al igual que otras especies de la familia Loranthaceae, es rica en flavonoides, especialmente flavonoles que podrían ser determinantes de su actividad farmacológica. Posee, además, una amplia distribución geográfica y crece sobre distintos hospedantes, por lo cual un efectivo control de calidad se hace indispensable.

Se desarrolló un método por electroforesis capilar que permitió establecer marcas de reconocimiento específico o *fingerprints* para la estandarización de los extractos. Esta metodología fue comparada con otras técnicas cromatográficas. La electroforesis capilar demostró ser una alternativa atractiva por su alta eficiencia de separación, costo reducido por su bajo consumo de solvente, lo cual la hace ecológicamente amigable, además, por la mínima cantidad de muestra requerida y los tiempos de análisis reducidos. Por todo lo expuesto, la electroforesis capilar puede ser utilizada eficientemente para el control de calidad de los extractos de *Ligaria cuneifolia*.

Los flavonoides presentes en los extractos pudieron ser identificados por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas (RMN y masa). Se determinó la presencia de quercetina-3-O-β-D-xilósido, quercetina-3-O-β-D-glucósido, quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosido, quercetina-3-O-α-L-arabinofuranósido, quercetina-3-O-α-L-ramnósido y catequina. Estos coinciden con hallazgos previos (Wagner, 1993; Vattuone y col., 2014).

Por otro lado, se determinó por primera vez en esta especie la presencia de quercetina-3-O-α-L-(2''-galoil)-ramnósido, querce-

Tabla 2- Condiciones del gradiente

Tiempo (m)	AcH-Agua (%)	AcH-MeOH (%)
0	85	15
25	60	40
50	60	40
60	15	85
65	0	100

tina-3-O-α-L-(3''-galoil)-ramnósido, quercetina-3-O-α-L-(2''-galoil)-arabinopiranosido y quercetina-3-O-α-D-(2''-galoil)-arabinofuranósido.

Referencias bibliográficas

- Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Rev. Mus. La Plata* (N. S.), Sec.Bot. 7: 1-110.
- Becker, H. (1986). "Botany of European Mistletoe (*V. album* L.)". *Oncology* 43 (1): 2-7.
- Dobrecky, C.; Moreno, E.; Garcés, M.; Lucangioli, S.; Ricco, R.; Eveson, P.; Wagner, M. (2014). "Contenido de polifenoles en *Ligaria cuneifolia* y su relación con la capacidad antioxidante". *Dominguezia* 30 (2): 35-39.
- Dobrecky, C. (2016). "Variación de los perfiles de polifenoles en *Ligaria cuneifolia*, su estudio mediante electroforesis capilar y su relación con la actividad farmacológica". *Tesis Doctoral*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. http://repositorioubasibsi.uba.ar/gsd/collect/posgraafa/index/assoc/HWA_1402.dir/1402.PDF
- Dobrecky, C.; Flor, S.; López, P.; Wagner, M.; Lucangioli, S. (2017). Development of a novel dual CD-MEKC system for the systematic flavonoid fingerprinting of *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh-Loranthaceae-extracts. *Electrophoresis* 38 (9-10): 1292-1300.
- Luther, P.; Becker, H. (1987) Die Mistel-Botanik, Lektine, medizinische Anwendung. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Varela, B.G.; Fernández, T.; Taira, C.; Zolezzi, P.C.; Ricco, R.A.; Caldas López, E.; Álvarez, E.; Gurni, A.A.; Hajos, S.; Wagner, M.L. (2001). "El 'muérdago criollo', *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh-Loranthaceae-. Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos". *Dominguezia* 17 (1): 31-50.