

ESTUDIO QUIMICO PRELIMINAR DE LOS FENOLES Y POLIFENOLES DE DOS ACCESIONES DE *Calliandra calothyrsus* (MIMOSACEAE)

RESUMEN

El objetivo de este estudio comparativo es conocer la composición química cualitativa y la concentración relativa de los fenoles y de los taninos condensados en dos accesiones de la especie forrajera *Calliandra calothyrsus* (Fabaceae Mimosaceae) cultivada y clasificada por el CIAT. El análisis por técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos permitió establecer claras diferencias en las dos muestras, no solo en cantidades sino en el número de derivados fenólicos observados. Entre los componentes fenólicos de bajo peso molecular identificados en las dos muestras sobresalen las isoflavonas: genisteína, prunetina y 7-O-glucosil-genisteína; catequinas, quercetina, miricetina y sus dihidroderivados, epigaloilcatequina, y galatos de epigaloilcatequinas. Entre los oligómeros, por MALDI-TOF y ESI en modo negativo se detectaron hasta pentámeros de catequinas en series de distintas combinaciones de monómeros según la regla Krueger.

PALABRAS CLAVES: Mimosaceae, *Calliandra calothyrsus*, compuestos fenólicos, poligaloilcatequinas, isoflavonas

ABSTRACT

Chemical composition and relative amounts of phenolic compounds and condensed tannins in two accessions of the forage tree Calliandra calothyrsus were evaluated. Chromatographic and spectroscopic techniques were used to find clear differences between the samples. Among mayor low mass compounds the isoflavones: genistein, prunetin and 7-O-glucosylgenistein were found. Furthermore catechins, quercetin, miricetin and their dihydroderivatives, EGC and EGCG were identified. By Maldit-of and ESI methods, until pentamers of different phenolic units, according the Krueger's rule, were detected.

KEYWORDS: Mimosaceae, *Calliandra calothyrsus*, phenolic compounds, polygalloylcatechins, isoflavones

1. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas las investigaciones en nutrición de rumiantes han promovido el uso del follaje de especies forrajeras arbóreas, nativas, silvestres o cultivadas como suplemento dietario por su valioso contenido de proteína. Entre estas, sobresalen algunas pertenecientes a la familia de las Leguminosas, de los géneros *Lotus*, *Flemingia*, *Leucaena*, *Vigna* y *Calliandra* entre otras, las cuales pueden contener diferentes porcentajes de taninos condensados (TC, 0-20%) cuya presencia ofrece algunas propiedades útiles en el aprovechamiento mejor de los nutrientes y otras menos deseables como disminuir la digestibilidad del forraje. Los taninos condensados (TC), son un grupo de polifenoles muy diversos, de amplia distribución en las plantas. Su unidad básica es el núcleo del flavano con diferentes patrones de oxidación, algunos poseen residuos de azúcares y forma oligómeros de gran diversidad estructural. Del género *Calliandra* se conocen algunos estudios relacionados con el contenido de

proteínas y su valor nutricional, además de ácidos de bajo peso molecular derivados del ácido piceólico [1]

Este trabajo tiene como objeto dar a conocer algunos de los resultados preliminares obtenidos en el estudio químico comparativo específicamente de los derivados fenólicos oligoméricos y sus respectivas unidades monoméricas presentes en las fracciones polares de los extractos alcohólicos ácidos de las hojas secas de dos accesiones de la especie arbórea *Calliandra calothyrsus* perteneciente a la familia Fabaceae, subfamilia Mimosaceae.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Material Vegetal. Las muestras de hojas secas y molidas fueron suministradas por el CIAT bajo la siguiente clasificación *Calliandra calothyrsus* 22310 denominada como CC1 y *C. calothyrsus* 22316 como CC2, provenientes de cultivos seleccionados de la región de Santander de Quilichao, Departamento del Cauca, Colombia.

BARBARA MORENO MURILLO

Química, Especialista
Profesora Asistente DE
Universidad Nacional de Colombia
bdmorenom@unal.edu.co

ANGELICA SANCHEZ T.

Estudiante de Química
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá.

RODOLFO QUEVEDO P.

Química Sc. D.
Profesor Asistente.
Universidad Nacional de Colombia
arquevedop@unal.edu.co

JUAN E CARULLA F.

Médico Veterinario. Sc. D.
Profesor Titular
Universidad Nacional de Colombia
jecarullaf@unal.edu.co

2.2 Extracción. El procedimiento seguido en este estudio incluye la extracción de los compuestos fenólicos totales de las muestras, por el método propuesto por Carulla JE, [2] con algunas modificaciones menores, tal como la separación del extracto por cromatografía de exclusión en gel (Gel permeation chromatography GPC) en una columna con la fase Sephadex LH-20, para así obtener dos fracciones mayores a saber: a) la fracción M_1 eluída con alcohol etílico para separar los derivados fenólicos simples, flavonoides e isoflavonoides, pigmentos residuales y monómeros de las protoantocianidinas. b) El residuo retenido en el gel, denominado muestra M_2 , esta constituido por los compuestos fenólicos de mayor peso molecular o taninos condensados (TC). Esta fracción se extrae de la columna por elución con una mezcla de acetona - agua (1:1, v/v), se concentra a presión reducida y se liofiliza para dar la muestra de TC. Esta mezcla se utilizó para diversos bioensayos *in vitro* y para el análisis de sus constituyentes mayoritarios por aplicación de métodos cromatográficos diversos y uso de algunas técnicas espectrométricas específicas.

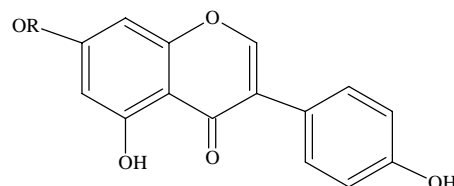
2.3 Estudio cromatográfico. Las fracciones M_1 y M_2 de las dos muestras de *C. calothyrsus*, fueron analizadas por técnica cromatográfica tales como Cromatografía en Capa Delgada Unidimensional y Bidimensional con varios sistemas de eluentes para determinar diferencias entre las variedades. Luego las muestras se sometieron a análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE). En este estudio se utilizaron dos columnas con fases estacionarias: la primera con ODS RP-C18 de 10 μ de tamaño de partícula, con diversos sistemas de fase móvil y gradiente de metanol-agua, acetonitrilo-agua y al final los resultados mejoraron con mezclas de metanol-acetonitrilo-agua; sin embargo, los resultados anteriores, condujeron a un cambio de fase estacionaria para lo cual se realizaron los análisis en la nueva fase constituida por gel de sílice modificada con cadenas tipo fenilhexilo promovidas como de mayor eficiencia para los polifenoles (LUNA 100 mm x 4 mm, 5 μ) [3,4]

2.4 Estudio espectroscópico. Las fracciones y compuestos se analizaron por Espectroscopia IR, UV y Espectrometría de masas para compuestos de alto peso molecular como son Ionización por desorción con láser asistida con una matriz y detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF), análisis por ionización con helio conocida como técnica DART y espectrometría de Ionización por Electro spray en modo negativo. (ESI).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Análisis cromatográfico de la Fracción M_1 . El estudio cromatográfico por CCD, de la fracción M_1 de la muestra 22316, permitió reunir las fracciones de composición similar y por Cromatografía en Columna repetitiva (CC) en gel de sílice, de las nuevas fracciones obtenidas, se obtuvo la separación y posterior purificación por cromatografía preparativa (CCDP) de

tres isoflavonas conocidas, derivadas del núcleo de la 4',5,7-trihidroxi-isoflavona, identificadas por IR, UV y RMN de ^1H como genisteína (**1**), el 7-metoxiderivado (prunetina) (**2**) y el 7-glucósido de genisteína (**3**), cuya elucidación estructural se realizó por métodos espectroscópicos de acuerdo a lo reportado por P. Dewick [5,6] (Figura 1)



1 R = H

2 R = CH₃

3 R = Glu

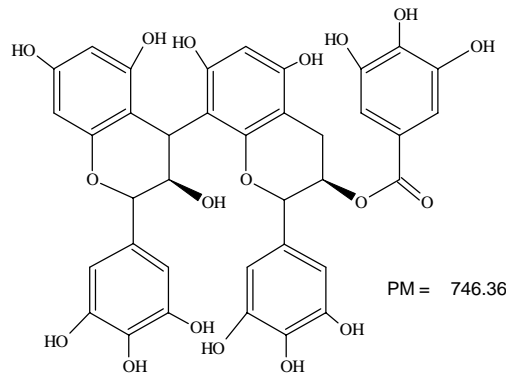


Figura 1. Los compuestos **1**, **2** y **3** son las isoflavonas identificadas como mayoritarias en el extracto ácido de *C. calothyrsus*. El compuesto **4** ilustra a manera de ejemplo el dímero de galoilcatequina de peso molecular 746,36 uma.

3.2 Análisis cromatográfico por CCD, de la Fracción M_2 . Las fracciones de TC liofilizadas, se obtuvieron como sólidos amorfos de color rosado suave de diferente tonalidad para cada accesión. Así mismo La cantidad relativa de TC fue diferente (22310, 12-14%, MS; para 22316, 9-10% MS). Estas muestras se analizaron por CCD en varios sistemas de diferente polaridad, observándose una composición similar en general, pero con diferencias notables en algunas bandas, las cuales permiten distinguir las dos accesiones, con notable énfasis en la abundancia relativa de los constituyentes, lo cual posteriormente se confirmó por el estudio por CCD bidimensional realizando el primer recorrido en el sistema (butanol: ácido acético: agua; 7: 2,5: 0,5) y el segundo recorrido en ácido acético al 30 %.

3.3 - Estudio de la fracción M₂ por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE). Ante la gran complejidad determinada por CCD, las muestras de taninos condensados fueron analizadas por CLAE en fase reversa Lichrospher (RP-ODS-C-18) de 250 mm x 4.6 mm de diámetro interno (di) y 10 μ de tamaño de partícula, eluyéndose con la fase móvil metanol-agua con gradientes de polaridad creciente. Después de un detallado estudio y selección del sistema cromatográfico mejor, como resultado los cromatogramas de estas fracciones presentan una región ancha de varios compuestos superpuestos, seguida de varias señales pequeñas diferentes para las dos accesiones 22310 y 22316. Para confirmar lo anterior, se realizaron análisis, en una columna LUNA, con otra fase fija, modificada con residuos tipo fenilhexilo, de 5 μ y 75 mm x 4.0mm de di. Los resultados fueron mejores permitiendo la separación de por lo menos 17 compuestos, o mezclas distintas, cuando se realizó la elución usando como fase móvil mezclas de acetonitrilo - agua - ácido tricloroacético 1%, con gradiente de 0-70% iniciando con agua y detección a 280 nm. Los registros de realizaron en un equipo Merck-Hitachi L-6200 con detector de arreglo díodos (DAD) [6]. El análisis comparativo de los cromatogramas muestra además notables diferencias entre las dos muestras bajo estudio, no solo en el número de señales observadas, sino en sus tiempos de retención relativos y actualmente se continúa con el proceso de separación de los constituyentes de cada fracción por CLAE preparativa.

3.4 – Análisis por Espectrometría de Masas

Con el fin determinar la composición química de las fracciones de TC, las muestras M₂ de cada accesión se sometieron a estudio por espectrometría de masas, utilizándose métodos específicos para compuestos de peso molecular elevado debido a su gran complejidad. En primera instancia se utilizó el método de ionización con helio DART, el cual presento con masas exactas los componentes mayoritarios de pesos moleculares bajos incluidos en la tabla 1.

	Compuestos	Masa	CC1	CC2
1	Ácido gálico	169.0136	90.0	70.1
2	dihidroxycumarina	177.0203	0.759	0.795
3	C ₉ H ₅ O ₅	193.0377	0.502	0.303
4	catequinas	289.0709	2.002	0.520
5	quercetina	301.0348	1.991	0.655
6	dihidroquercetina	303.0505	1.089	0.798
7	C ₁₄ H ₁₁ O ₁₀	339.032	99.09	99,34

Tabla 1. Compuestos fenólicos mayoritarios determinados en las dos accesiones de *Calliandra calothyrsus*, como abundancia relativa del ión M⁺-1, por el método DART.

Para los oligómeros se aplicó la técnica de MALDI-TOF, de acuerdo a los métodos propuestos por Yang Y et al [4] and Reed et al [7] utilizándose tres matrices diferentes

a saber: ácido sinapínico (SA), ácido dihidroxibenzoico (DHB) y ácido cianocinámico (CCA) de registros realizados en los Laboratorios de Química Orgánica de la Universidad de Innsbruck, Austria. Los registros ESI en modo negativo fueron realizados en el centro de espectrometría de masas del centro superior de investigaciones científicas CSIC de Madrid, España.

	Compuestos	Masa	CC1	CC2
1	Trihidroxisoflavona	269.0438	8.395	7.01
2	tetrahidroxiflavona	285.0399	28.555	15.956
3	catequina	289.0712	0.502	0.456
4	quercetina	301.0348	2.002	0.520
5	dihidroquercetina	303.0505	1.991	0.655
6	miricetina	317.0209	10.089	7.250
7	dihidromiricetina	319.0454	2.4008	1.0235
8	ECG	441.0822	1.2304	1.0198
9	EGCG	457.0771	2.6894	1.9876
10	C ₁₄ H ₁₁ O ₁₀	339.0327	100.00	9.5561

Tabla 2. Compuestos mayoritarios determinados en las dos accesiones de *Calliandra calothyrsus*, como abundancia relativa del ión M⁺-1, por espectrometría de ionización por electrospray en modo negativo.

La tabla 2 muestra la composición relativa de otros fenoles determinados por Espectrometría de masas MALDI-TOF, Y DART, en el rango de los monómeros, unidades que por diversas reacciones enzimáticas, van a formar parte de la fracción de los taninos y a contribuir según su concentración relativa a las propiedades astringentes y de digestibilidad de los suplementos dietarios bajo estudio.

Los resultados muestran la presencia de dímeros y trímeros en mayor proporción en la accesión 22310 pero con diferencias en el ensamble entre los monómeros reflejado en los valores de los iones moleculares observados. Los iones moleculares mayores, obtenidos por este método se observan en el rango de 1350 a 1600 Da, (matriz DHB). El análisis comparativo de los registros obtenidos con las tres matrices, de las señales de los iones pseudo moleculares, M⁺+1 M⁺+Na y M⁺+K obtenidos por Maldí, junto con los resultados observados en los registros por ionización por electrospray en modo negativo (M⁺-1) permitió determinar como componentes mayoritarios una serie de poligaloilcatequinas, desde los dímeros hasta pentámeros con diferente combinación de residuos de catequinas y de ácido gálico, según la fórmula propuesta por Reed et al. (7) donde el ión molecular es

$$M^+ = 290 + 288n + 152g - 1,$$

donde **n** es el número de unidades de catequinas y **g** es el número de residuos de ácido gálico, en grupos de diferente grado de oxigenación detectados a través de los iones M⁺, M⁺+16 y M⁺+32, según se observa en la tabla 3. La figura 1 muestra a manera de ejemplo la

estructura (4), correspondiente al dímero de peso molecular 746,36 uma

n	G	M ⁺	M ⁺ +16	M ⁺ +32
1	1	729	745	761
1	2	881	897	913
2	2	1033	1049	1065
2	3	1185	1201	1217
3	3	1337	1353	1369
5	3	1908	1924	1940

Tabla 3. Poligaloilcatequinas determinadas en las fracciones M₂, de las dos accesiones de *C. calothyrsus*, por estudio detallado de los espectros de Malditof, en matriz DHB y Espectrometría de ionización por electrospray ESI.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Este trabajo constituye, en lo mejor de nuestro conocimiento, el primer reporte sobre la composición química de los extractos polares de las dos accesiones mencionadas. De los resultados analizados se puede concluir que los extractos ácidos de las dos muestras de la especie *C. calothyrsus*, poseen una serie de fenoles y polifenoles de peso molecular diverso. Entre los compuestos mayoritarios de peso molecular en el rango de 100 a 400 Daltons, sobresalen por su cantidad el ácido gálico, la genisteína y su 7- metil- derivado (prunetina), quercetina y miricetina y sus dihidroderivados, así como un compuesto de peso molecular 340.032 uma, de fórmula C₁₄H₁₂O₁₀, el cual aparece como el más abundante y se encuentra en proceso de purificación para la determinación inequívoca de su estructura, aunque dadas las condiciones suaves del método DART, puede proponerse como probable estructura para la señal observada a 339,03 como el dímero del ácido gálico menos H. Entre las unidades poliméricas de la fracción de los taninos condensados, como constituyentes mayoritarios fueron determinados varias series de poligaloilcatequinas en grupos de diferente grado de hidroxilación, los cuales concuerdan muy bien con la conocida regla de Krueger [7]

Se continúa con el análisis de las demás señales observadas en los registros MALDI-TOF y con la purificación de otros metabolitos presentes en los extractos bajo estudio. Se considera de gran interés el conocimiento de la composición química de las especies forrajeras que crecen en nuestros suelos de la zona tropical para poder correlacionarla con las propiedades biológicas que poseen y poder proyectar potenciales aplicaciones que redunden en el mejoramiento de la producción de los rumiantes.

5. BIBLIOGRAFÍA

[1] BLEECKER AB, Romeo JT.- 2,4,trans-4,5-trans-4,5-dihydropipecolic acid and cis-5-hidroxipecolic acid

acid from leaves of *Calliandra angustifolia* and sap of *C. confusa*. *Phytochemistry* **20**, 1845-1846, 1981.

[2] CARULLA JE, Lascano CE, Klopfenstein T. Reduction of tannin level in tropical legume (*Desmodium ovalifolium*) with polyethylene glycol (PEG): effects on intake and N balance, digestion and absorption by sheep. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. **9** (1), 17-24, 2001

[3] PORTER LJ. Structure and chemical properties of the condensed tannins In: Plant polyphenols, synthesis, properties, Significance. Edited by RW Hemingway and P. Laks. Plenum Press, New York & London, 245-258, 1992.

[4] YANG Y, Chien M. – Characterization of grape procyanidins using high performance liquid chromatography / mass spectrometry and matrix – assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem* **48**, 3990-3996, 2000.

[5] DEWICK PM. Isoflavonoids. In: The Flavonoids Advances in research. Ed. JB Harborne, and TJ Mabry Chapman & Hall, London, New York chap 10, 535-640. 1982

[6] DEWICK PM. Isoflavonoids. In: The Flavonoids Advances in research since 1986 Ed. JB Harborne Chapman & Hall, London chap 5, 117-232. 1994.

[7] REED JD, Krueger CG, Vestling MM.- MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry* **66**, 2248-2263. 2005.