

Análisis fitoquímico preliminar y huella digital cromatográfica de hojas de *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke, “tarumá”

Preliminary phytochemical analysis and chromatographic fingerprint of leaves of *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke, “tarumá”

Javier Michajluk¹, Diana Bazán², Yenny González³, Nelson Alvarenga^{2*}

¹Departamento de Bioquímica de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

²Departamento de Fitoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción; *e-mail: nelsonluis7@yahoo.es

³Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción.

Resumen: La especie *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke, conocida como “tarumá”, perteneciente a la familia Verbenaceae, es una planta utilizada en la medicina popular en Paraguay. La infusión de sus hojas se emplea principalmente como antimicrobiana, antiinflamatoria y antiparasitaria. El propósito del presente estudio fue analizar el perfil fitoquímico y los componentes volátiles del extracto metanólico de hojas de “tarumá”. Las muestras se cosecharon del Barrio Madame Lynch de Asunción y para el análisis se emplearon reacciones de precipitación, coloración y cromatografía en capa fina. Los resultados indicaron presencia positiva para esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos y leucoantocianidinas. Los componentes volátiles fueron analizados por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas. Fitol y metil ésteres de ácidos grasos se detectaron como componentes volátiles principales. La presencia de algunos de los metabolitos secundarios identificados en el extracto metanólico podría ser beneficiosa en el tratamiento de ciertas patologías que afectan a la salud humana.

Palabras clave: análisis fitoquímico, huella digital cromatográfica, *Vitex megapotamica*.

Summary: *Vitex megapotamica* (Spreng) Moldenke, known as Tarumá, belonging to the Verbenaceae family, is a plant used in folk medicine in Paraguay. The infusion of its leaves is used mainly as antimicrobial, anti-inflammatory and antiparasitic. The purpose of the present work was to analyze the phytochemical profile and the volatile components of the methanolic extract of *V. megapotamica* leaves. The samples were harvested from the Madame Lynch district of Asunción and precipitation and coloration reactions along with thin layer chromatography were used. The results indicated positive presence for steroids, triterpenes, flavonoids, tannins and leucoanthocyanidins. The volatile components were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Phytol and methyl esters of fatty acids were detected as main volatile components. The presence of some of the secondary metabolites identified in the methanolic extract could be beneficial in the treatment of certain pathologies that affect human health.

Key words: chromatographic fingerprint, phytochemical analysis, *Vitex megapotamica*.

Manuscrito recibido: agosto de 2016.

Manuscrito aceptado: marzo de 2017.

Introducción

La familia *Verbenaceae* se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales, sub tropicales y templadas del hemisferio austral, siendo menos numerosa en el hemisferio boreal (Bacigalupo, 1993). En el Cono Sur de las Américas comprende 28 géneros, 256 especies, 139 especies endémicas, de las cuales 99 se encuentran registradas en el Paraguay (Zuloaga et al. 2008).

Las especies más empleadas en el país debido a sus propiedades medicinales tales como digestivas, protectores hepáticos, calmantes, diuréticos, antiespasmódicos o antidiabéticos son las de origen nativo: *Aloysia gratissima* (Gillie and Hook.) Tronc., “poleo í” y *Citharexylum Myrianthum* Cham., “sarã moroti”, las cultivadas *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke, “burrito” y *Aloysia Citriodora* Palau, “cedrón Paraguay”, de acuerdo a lo citado por Ibarrola y Degen (2011).

Según Bacigalupo (1993), esta familia, comprende hierbas, arbustos o árboles con hojas generalmente opuestas, a veces alternas o verticiladas, simples o compuestas, digitadas con 3 a 7 foliolos como en el caso de *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, que es una árbol conocido en el Paraguay como “tarumá”, el cual puede alcanzar hasta 20 m de altura y con un diámetro de tronco de hasta 60 cm. Florece de setiembre a noviembre, siendo fácilmente identificable por el color lila de su copa. En el país se lo encuentra habitando en zonas bajas de la Región Oriental y el Chaco húmedo y en el Brasil se lo encuentra distribuido desde los Estados de Minas Gerais hasta Rio Grande do Sul (Michajluk et al. 2014).

Las plantas son empleadas desde hace mucho tiempo en la medicina popular para el tratamiento de numerosas enfermedades, el uso de extractos de plantas con fines terapéuticos alcanzó gran popularidad en la década de 1990, donde investigadores en todo el mundo incrementaron la búsqueda de compuestos de origen vegetal con efectos benéficos para la salud humana (Alvarenga et al. 2012).

En relación al uso terapéutico del “tarumá”, la infusión de sus hojas es utilizada para el tratamiento de hemorroides, como diurético, expectorante, en afecciones cutáneas, para disminuir la presión arterial, como antiinflamatorio, hipoglucemiante y antiirreumático (De Brum et al. 2011).

En un estudio realizado por Oliveira et al. (2015), se comprobó que los extractos metanólicos de hojas de “tarumá” eran capaces de reducir el stress oxidativo y los lípidos sanguíneos y prevenir daños renales cuando eran administrados a ratones por vía oral. Otro estudio realizado por Becker et al. (2016) en diferentes extractos de hojas de “tarumá”, demostró además que el potencial antioxidante de estos extractos implicaban mecanismos de secuestro de radicales libres, particularmente en los extractos más polares, extrayendo mayores cantidades de los mismos los constituyentes fenólicos de los extractos. Sin embargo, a pesar de que toda la evidencia apunta a los compuestos fenólicos como responsables de estos efectos, otros metabolitos que pudieran colaborar de manera integrada a los efectos terapéuticos de esta especie no deberían ser excluidos.

En los últimos años se han logrado importantes avances en investigaciones químicas y farmacológicas de plantas medicinales, se han obtenido nuevos compuestos de origen

natural con propiedades terapéuticas tan eficientes como aquellos que se obtienen por síntesis química (De Brum et al. 2011).

En el Paraguay no existen registros de trabajos o publicaciones científicas nacionales referentes a la composición química del extracto de sus hojas. La información que se encuentra disponible, en todos los casos corresponde a investigaciones realizadas en el extranjero y en ese sentido, constituye un desafío iniciar trabajos de investigación que aporten información acerca de la composición química y los efectos benéficos para la salud humana del extracto de hojas del “tarumá”.

Teniendo en cuenta lo mencionado arriba, la presente investigación tuvo como objetivo describir el perfil fitoquímico y los componentes volátiles del extracto de hojas de *V. megapotamica*, “tarumá”.

Materiales y Métodos

Material Vegetal:

Las hojas de Tarumá (**Fig. 1. A**) fueron colectadas en el mes de febrero de 2016 a través de un muestreo por conveniencia de las coordenadas latitud sur 25° 16' 00,1" y longitud oeste 57° 33' 07,1" en el Barrio Madame Lynch de Asunción, Paraguay.

Se realizó la identificación botánica de la planta, para lo cual se contó con la colaboración de profesionales del Dpto. de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNA y un ejemplar de la misma se depositó en el Herbario FCQ, bajo el código YG-112.

Obtención del Extracto de hojas:

Las hojas de “tarumá” fueron secadas en estufa de aire circulante a 40°C durante 5 días. Luego las hojas secas fueron reducidas a polvo fino en un molino a cuchillas (**Fig. 1. B-C**).

El polvo fino y seco fue sujeto a extracción con metanol grado p.a. en una proporción de 200 g de muestra seca por litro de metanol a temperatura ambiente por cinco días. Posteriormente la muestra fue filtrada y el solvente eliminado por evaporación a presión reducida con un equipo evaporador rotatorio a una temperatura de 40 °C (**Fig. 1. D**). El extracto seco obtenido fue conservado en un recipiente hermético y a una temperatura de 10 °C hasta la realización del análisis fitoquímico.

Ensayo fitoquímico del extracto metanólico:

Para la determinación del perfil fitoquímico del extracto metanólico de hojas, se realizaron pruebas cualitativas empleando reacciones de precipitación, coloración (**Fig. 1. E**) y cromatografía en capa fina (TLC) (**Fig. 1. F**) según la metodología descrita por Sanabria-Galindo (1983) con el fin de determinar presencia de metabolitos secundarios, tales como alcaloides, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, naftoquinonas y antraquinonas, saponinas, leucoantocianidinas, cardiotónicos, terpenos (lactonas terpénicas), cumarinas, cardenolidos y lactonas α - β insaturadas.

Determinación del perfil cromatográfico de los componentes volátiles:

Se empleó un cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrómetro de masas marca Shimadzu, modelo 2010 plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna Rtx-5MS de 30 m de longitud, 0,25 mm

de diámetro y $0,25 \mu$ de espesor de fase estacionaria, temperatura del inyector $250 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura del detector $220 \text{ }^\circ\text{C}$, elución con rampa de temperatura iniciando a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. y luego incrementando hasta $220 \text{ }^\circ\text{C}$ a $7 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min.}$ y manteniendo esa temperatura por 10 min. La velocidad lineal del gas carrier fue de $35 \text{ cm}/\text{seg.}$, la inyección se realizó en modo Split (radio 1:20) y el volumen de inyección fue de $1 \mu\text{L}$. En relación al espectrómetro de masas, se utilizó el modo Scan, con un voltaje de $1,4 \text{ kV}$ y un rango de masas de 35 a $400 \text{ m}/\text{z}$.

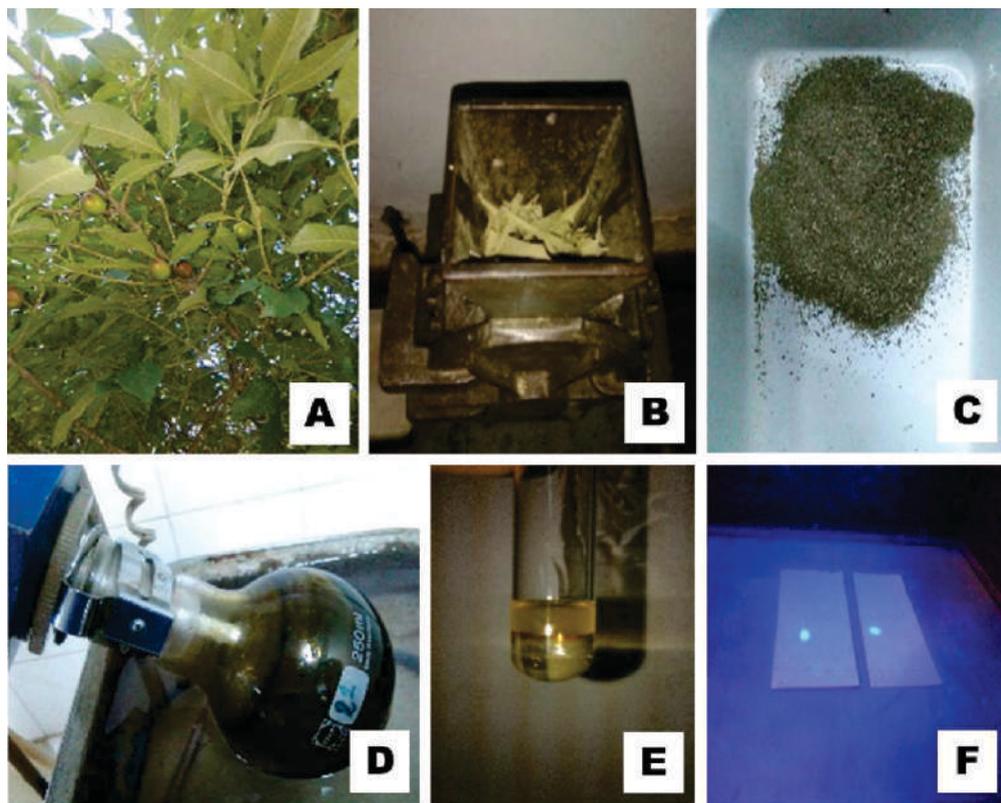


Fig. 1. A-F. *Vitex megapotamica*: Proceso de obtención del extracto. **A.** Hojas colectadas. **B.** Molienda de las hojas en el molino de cuchillas. **C.** Polvo de la hoja. **D.** Evaporación del solvente en el evaporador rotatorio. **E.** Reacciones de coloración. **F.** Identificación por cromatografía en capa fina (TLC).

Resultados y Discusión

Perfil fitoquímico:

De la extracción con metanol, se obtuvieron $101,2 \text{ g}$ de extracto seco a partir de $644,4 \text{ g}$ de hojas de *V. megapotamica*. El rendimiento fue del $15,7\%$.

Los resultados del ensayo fitoquímico preliminar del extracto metanólico se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Perfil Fitoquímico *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke (Verbenaceae).

Metabolitos secundarios	Resultado
Alcaloides	Negativo
Esteroides y Triterpenos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Taninos	Positivo
Naftoquinonas y Antraquinonas	Negativo
Saponinas	Negativo
Leucoantocianidinas	Positivo
Cardiotónicos	Negativo
Lactonas terpénicas	Negativo
Cumarinas	Negativo
Cardenolidos y Lactonas α - β insarutadas	Negativo

En relación a los resultados obtenidos en el extracto metanólico de hojas de “tarumá”, los mismos coinciden con los obtenidos por De Brum et al. (2011) en un estudio realizado en el Brasil sobre un extracto alcohólico al 70%.

Los resultados negativos no implican necesariamente que estos metabolitos estén ausentes, ya que es posible que los mismos se encuentren en bajas concentraciones por lo cual no han podido ser detectados por la metodología empleada.

Respecto al análisis cromatográfico de la fracción volátil del extracto (**Fig. 2**), los resultados se exponen en la **Tabla 2**.

Como puede observarse, el componente mayoritario es el diterpeno lineal fitol. Se observa que se encuentran presentes alcanos, algunos de peso molecular elevado y ésteres metílicos de ácidos grasos. Cabe destacar que una parte de los componentes no se pudo identificar por no coincidir sus espectros de masa con los existentes en las bases de datos del equipo utilizado en su análisis.

La presencia de los metabolitos secundarios identificados por análisis preliminar en el extracto metanólico de frutos de *V. megapotamica* indican que los mismos podrían ser los responsables de la acción terapéutica atribuida a la planta en el tratamiento de ciertas patologías que afectan a la salud humana, pues según De Brum et al. (2013) los compuestos fenólicos actúan inhibiendo la peroxidación lipídica y a la enzima lipoxigenasa, y la presencia de estos compuestos podría conferir actividad antiinflamatoria e hipolipidémica.

Por otro lado, los triterpenos y esteroides encontrados poseen actividad antiinflamatoria, las leucoantocianidinas y flavonoides poseen además actividad antiinflamatoria y ejercen acción antiviral, antimicrobiana y antioxidante (De Brum et al. 2011).

En lo que respecta a los componentes volátiles, fitol fue el compuesto mayoritario detectado y el mismo ha demostrado actividad antinociceptiva y antioxidante en un estudio en modelos *in vivo* e *in vitro*, lo cual reforzaría la acción antioxidante de los compuestos fenólicos y podría contribuir al efecto antiinflamatorio atribuido a la planta (De Menezes et al. 2013).

Se han descrito numerosas actividades biológicas para los metabolitos detectados, por lo cual, se debería realizar un mayor número de ensayos en relación a las actividades antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y antioxidantes de las fracciones de los extractos metanólicos.

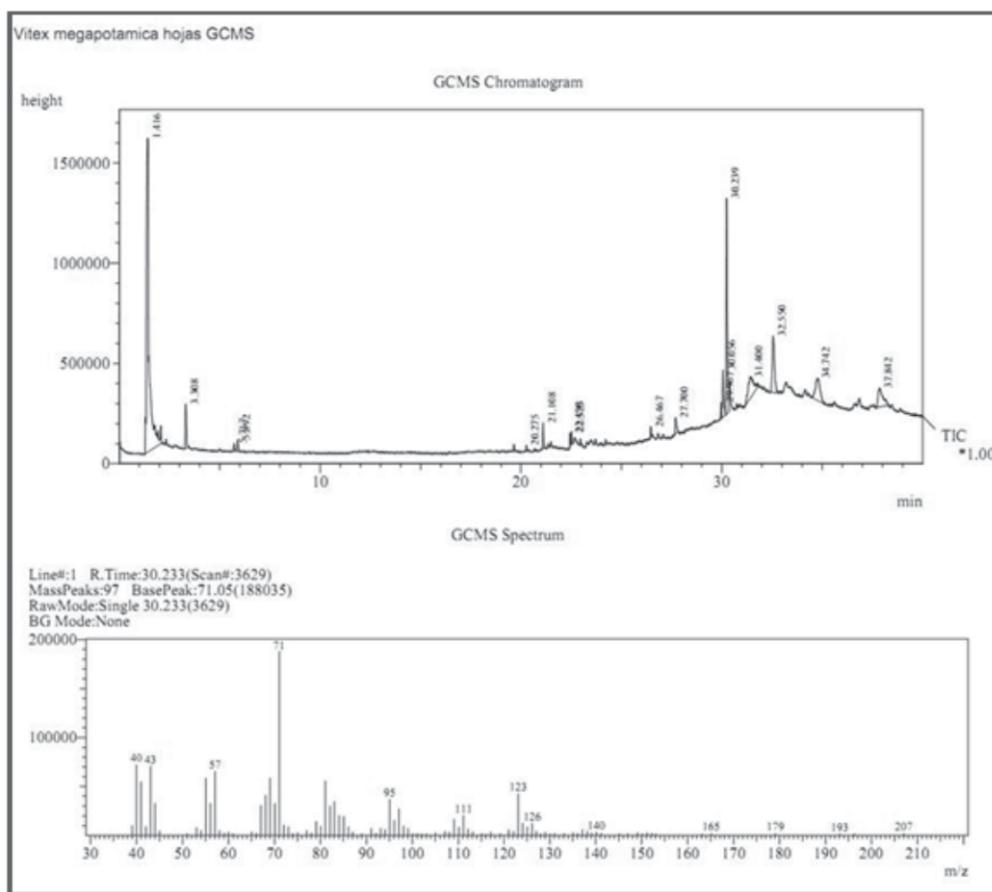


Fig. 2. Espectro del extracto de *Vitex megapotamica*, en el Cromatógrafo gaseoso acoplado a masa.

Tabla 2. Componentes volátiles identificados del extracto metanólico de *V. megapotamica*.

Tiempo de retención (min)	Área	% Área	Compuesto
3.308	915438	3.01	2,2-dimetoxibutano
27.700	373066	1.23	14-metilpentadecanoato de metilo
29.967	144888	0.48	Linoleato de metilo
30.056	1021080	3.36	Linolenato de metilo
30.239	4231512	13.92	Fitol
31.400	2022876	6.65	Linoleato de l-glicerilo
32.550	2180274	7.17	Tetracontano
34.742	1851993	6.09	Tetratetracontano

Conclusión

El análisis del perfil fitoquímico y la determinación de los componentes volátiles por GCMS realizado en el extracto metanólico de hojas de *Vitex megapotámica* (Spreng.) Moldenke (*Verbenaceae*) permitió conocer los diferentes metabolitos secundarios presentes y relacionarlos con sus posibles acciones descritas en la literatura en la salud humana. La información adquirida es de suma importancia debido a que en el país no existían datos acerca de la composición química del extracto de hojas de “tarumá”. Los resultados obtenidos nos permiten considerar futuros trabajos que nos permitirán profundizar aún más en los conocimientos sobre la composición química de esta especie debido a que los datos sobre esta planta en nuestro país son limitados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Dora Franco, por la traducción del resumen, del español al inglés.

Referencias bibliográficas

- Alvarenga, N., Hiebert, M. y Bazán, D. (2013). Composición química y actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Begonia cucullata* Willd. var. *cucullata* (agrial). *Investigaciones y estudios de la UNA*, 8(1), 21-31.
- Bacigalupo, N. (1993). *Flora de la Provincia de Jujuy. Parte IX. Verbenáceas a Caliceráceas*. Colección Científica del INTA. Ed. Estudio Sigma SRL. Buenos Aires, Argentina.
- Becker, S., Abatti, D., Tessaro, A.A. y Buss Tessaro, A. (2016). Total Phenolic, Flavonoid Content and Antioxidant Activity of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke. *Ciencia e Natura*, 38 (3), 1197-1204. Recuperado el 30 de octubre de 2016 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467547716006>.

- De Menezes, C.C., Santos, P., Stiebbe Salvadori, M., Gomes Mota, V., Muratori Costa, L., Cardoso de Almeida, A.A., et al. (2013). Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol *In Vivo* and *In Vitro* Models. *Neuroscience Journal*. 2013, 1-9. Article ID 949452, 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/949452>
- De Brum, T.F., Zadra, M., Froeder, A.L.F., Boligon, A.A., Frohlich, J.K. y Athayde, M.L. (2011). Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Saúde* 2: 57 – 42. DOI: <http://dx.doi.org/10.5902/223658343088>
- De Brum, T.F., Zadra, M., Piana, M., Boligon, A.A., Frohlich, J.K., De Freitas, R.B., et al. (2013). HPLC Analysis of Phenolics Compounds and Antioxidant Capacity of Leaves of *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Molecules* 18: 8342-8357. doi:10.3390/molecules18078342
- Ibarrola, D.A. y Degen de Arrúa, R. (Eds). (2011). *Catálogo ilustrado de 80 Plantas Medicinales del Paraguay*. Facultad de Ciencias Químicas-UNA & Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA).
- Michajluk, J., Wiszobaty, L., Piris, P., Mereles, L. y Caballero, S. (2014). Estudio del valor nutricional de frutos de *Vitex megapotamica*, “tarumá”. *Rojasiana*, 13 (2), 45-51.
- Oliveira, V., Gasparotto, F.M., Pires, V.A., Maciel, A.A., Ortmann, C.F., Cardozo Junior, E.L., Lourenço, E.L. y Gasparotto Junior, A. (2015). Renoprotective effects of *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke in C57BL/6 LDLr-Null mice undergoing high fat diet. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015, Article ID 475380. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2015/475380>.
- Sanabria-Galindo, A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia. Bogotá. Colombia. S/E.
- Zuloaga, F. y Morrone, O. y Belgrano, M. (Eds.). (2008). *Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) III*. Págs.: 3102 – 3151. St. Louis. USA: Missouri Botanical Garden.