



EXTRACTION, SEPARATION, AND IDENTIFICATION OF THE CAROTENOID-XANTHOPYLL, NEOXANTHIN, BY HPLC-MS FROM THE FOOD SPECIES *INGA INGOIDES* (RICH) WILLD, PACAY, COLLECTED IN COROICO, BOLIVIA

EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN, E IDENTIFICACIÓN DEL CAROTENOIDE Y XANTÓFILO NEOXANTINA POR HPLC-MS DE LA ESPECIE ALIMENTICA *INGA INGOIDES* (RICH) WILLD, PACAY, COLECTADA EN COROICO, BOLIVIA

Received 09 29 2020
Accepted 12 01 2020
Published 12 30 2020

Vol. 37, No.5, pp. 233-237, Nov./Dic.2020
Revista Boliviana de Química

37[5]], 233-237, Nov./Dec. 2020
Bolivian Journal of Chemistry
DOI: 10.34098/2078-3949.37.5.3



Short report

Peer-reviewed

Willy J. Rendón P.^{1,*}, Galia Chávez¹, Marcelo Bascopé², J. Mauricio Peñarrieta³, Patricia Mollinedo³

¹Natural Product Laboratory, Instituto de Investigaciones en Productos Naturales IIPN, Chemical Sciences Department, Facultad de Ciencias Puras y Naturales FCPN, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, phone +59122792238, La Paz, Bolivia, wjrendon1@umsa.bo, www.umsa.bo

²Centro de Investigaciones Químicas S.R.L., Calle Junín s/n, Zona Sapenco, Quillacollo, phone +59172288963, fax +59144391763, Cochabamba, Bolivia, marbascope@hotmail.com, www.ciq-srl.com

³Food Chemistry Laboratory, Instituto de Investigaciones Químicas IIQ, Chemical Sciences Department, Facultad de Ciencias Puras y Naturales FCPN, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, phone +59122795878, La Paz, Bolivia, jmpenarrieta1@umsa.bo, pamollinedo@umsa.bo, www.iiq.umsa.bo

Keywords: *Neoxanthin, Carotenoids, Pacay, Inga ingoides.*

Palabras clave: *Neoxantina, Carotenoides, Pacay, Inga ingoides.*

ABSTRACT

The present work describes the isolation and characterization of neoxanthin obtained in the aerial part of the plant species *Inga ingoides* collected in the town of Coroico in the Department of La Paz, Bolivia. The plant was subjected to extraction processes and column chromatography on silica gel, with a mobile phase of petroleum ether / ethyl acetate with an increasing polar gradient. The major fraction of reddish colour was chromatographed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry HPLC_MS, being determined the presence of neoxanthin.

*Correspondent author: wjrendon1@umsa.bo



RESUMEN

En el presente trabajo se describe el aislamiento y caracterización de neoxantina obtenida en la parte aérea de la especie vegetal *Inga ingoides* colectada en la localidad de Coroico del Departamento de La Paz, Bolivia. La planta fue sometida a procesos de extracción y de cromatografía en columna sobre sílica gel, con fase móvil de éter de petróleo/acetato de etilo de gradiente polar creciente. La fracción mayoritaria de cromatografía de coloración rojiza obtenida, fue sometida a cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas HPLC_MS determinándose la presencia de neoxantina.

INTRODUCCIÓN

Los bosques húmedos montañosos cobijan una gran variedad de familias botánicas como: Loraceae, Sapotaceae, Lauraceae, Meliaceae, Burseraceae, Sapinolaceae, Piperaceae, Rubiaceae, Leguminaceae, etc. Dentro la familia Leguminaceae se encuentra el género *Inga* una Mimosoideae.

El género *Inga* está presente en la naturaleza en forma de arbustos, árboles pequeños hasta medianos, la especie *Inga ingoides* es originaria de la región de Coroico, provincia Noryungas, La Paz, y es conocida por el nombre común de *Pacay*. A éste género pertenecen unas 250 especies botánicas distribuidas en regiones cálidas y húmedas de América, el fruto es agradable al paladar y es consumido por los habitantes de estas regiones e incluso comercializadas en las poblaciones cercanas al lugar de su hábitat [1].

En Bolivia se encuentran catalogadas 54 especies botánicas del género *Inga*, varias de estas especies son usadas con propósitos medicinales, por ejemplo el fruto crudo en el tratamiento de la diabetes [2], las hojas para el tratamiento de la bronquitis, diversas diarreas, así también es usado como anti inflamatorio y presenta un elevado poder antioxidante. [3].

Entre las sustancias químicas caracterizadas en estas especies vegetales se encuentra la ingasaponina aislada de *I. laurina* con actividad auxiliar inmunológica [4], así como de *I. marginata*. En general se detectaron saponinas, taninos, fitoesteroles, triterpenos, estigmasterol, alcanos de cadena larga y de los gajos se aislaron lupeol, lupenona, fricoletina y antraquinonas como fisciona y emodin y de las hojas emodin, quercetina, fisciona y ácido kaurénico [5], y un amino ácido no proteico, *trans*-4-metoxipipcólico de las hojas de *I. paterno* [6].

En el aceite esencial de las hojas de *I. laurina* se encontraron 30,05 % de terpenoides, 9,76 % de fitol, en la corteza de la planta encontraron ésteres como: Z-hex-3-enil-benzoato en 10,15 % y el mayor componente del aceite esencial es la Z-hex-3-en-1-ol-benzoato con un 14,23 %, terpenoides 33,84 %, alcanos de cadena larga 27,04 %, y ácidos grasos 21,72 %, los mayores componentes del aceite esencial de las hojas fueron: Fitol 33,21 %, nonacosano 21,95 % y ácido palmítico 15,20 %. El aceite esencial de *I. laurina* mostró una buena inhibición bacteriana [7].

Otros investigadores también pudieron determinar propiedades antioxidantes como es el caso de la *I. edulis* debido a la presencia de compuestos fenólicos. [8]

De acuerdo a estudios realizados por otros investigadores la especie *Inga ingoides* posee propiedades antioxidantes incluida la vitamina C, los carotenos y las xantofilas, estos dos últimos poseen colores rojo a amarillo, los cuales han sido usados para darles pigmentación a algunos animales como es el caso de la tilapia, *Oreochromis niloticus* [9].

Los carotenos son pigmentos liposolubles sintetizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas, por sus características estructurales son sensibles al oxígeno, metales, ácidos, calor, luz y las lipoxigenasas. Algunas de estas moléculas tienen capacidad de actuar como precursores de la vitamina A [10-12]. La neoxantina es un carotenoide y xantofila, presente en plantas en forma de isómeros *trans* y *9-cis*. Fue reportada en Tomates [13]. Su rol específico en las plantas es la protección contra el estrés foto oxidativo [14].

EXPERIMENTAL

Material vegetal

Partes aéreas de la planta fueron colectadas en la localidad de Coroico, Provincia Nor Yungas del Departamento de La Paz. Un espécimen voucher fue depositado bajo WR-101 en el Herbario Nacional de Bolivia, donde, la especie vegetal fue clasificada como *Inga ingoides*.

Reactivos



Los reactivos utilizados en la presente investigación fueron los siguientes: Chloroformo (p.a.), metanol (grado HPLC) y tolueno (p.a.) Merck (Darmstadt, Germany), ácido fórmico, ácido clorhídrico, bicarbonato de sodio (p.a.), cloruro de sodio (p.a.), H₂SO₄ (p.a.), y silica gel de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Cromatografía en Columna

La parte aérea (Hojas y tallos) de la especie *Inga ingoides* fue limpiada, secada y molida (1621g.), fue tratada con éter de petróleo, el extracto seco etéreo (13 g.), fue sometido a una cromatografía en columna sobre silica gel, eluyéndose en principio con éter de petróleo y posteriormente con mezclas de diferentes concentraciones de éter de petróleo y acetato de etilo de gradiente de polaridad creciente, la fracción eluida con éter de petróleo-acetato de etilo (5:1 v/v) fue la que mostró la presencia de sustancias coloridas rojizas.

Cromatografía de Alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas HPLC-MS

El análisis HPLC-MS se llevó a cabo en una columna Purospher® RP-18 (5 µm) en un módulo de separación Waters 2695, con una fase móvil compuesta de ácido fórmico al 0,1% en agua como solvente A y metanol como solvente B. Velocidad de flujo: 1mL min⁻¹. El analito, se separó mediante elución isocrática usando A / B = 35/65 (v / v) en 15 min. El compuesto se detectó con un espectrómetro de masas Waters Quattro ESI operado en modo positivo., modelo 4micro (Milford Massachusetts, USA). La fracción eluida con tiempo de retención [11,77 min..] fue identificada como el compuesto **1**, después del análisis de ESI-MSMS: ESI-MS / MS.

Espectrometría de masas: electrospray ionization MS/MS [13]

Análisis ESI-MSMS: ESI-MS / MS se realizó en un instrumento Waters Quattro Micro que funciona en modo de iones positivos (Electrospray). La adquisición de datos se llevó a cabo con el software MassLynx 4.1 con los siguientes ajustes: voltaje capilar, 2500 V; voltaje de cono, 30 V; extractor, 2 V; RF, 0,0 V; temperatura de la fuente, 120 ° C; temperatura de desolvatación, 350 ° C; flujo de gas de cono, 50 L / h; flujo de gas de desolvatación, 350 L / h; Resolución LM 1, 15; Resolución HM 1, 15; energía iónica 1, 0,2; Entrada al modo MS / MS, 15; Energía de colisión MSMS, 30 eV (Gal-6S-P) y 30 eV (Gal-6S-IS); Salida del modo MS / MS, 15; Resolución LM 2, 15,0; Resolución HM 2, 15,0; energía iónica 2, 2,0; Multiplicador, 650; presión de la celda de colisión, <10-4 mbar; gas de colisión, argón. La muestra se introdujo mediante infusión directa con un caudal de 10 µl / min; espectrómetro del Centro de Investigaciones Químicas S.R.L (Responsable: Dr. Marcelo Bascope).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pigmentos naturales como los carotenoides han sido hallados en animales y plantas y han hallado aplicación en la protección contra ciertas formas de cáncer, así como en enfermedades cardíacas, regeneración de células musculares relacionadas con la edad, siendo importante su acción contra el daño oxidativo de macromoléculas. La búsqueda de compuestos eficientes antioxidantes incluye a los carotenoides que han demostrado que a través de su consumo pueden disminuir la incidencia de ciertas enfermedades, además representan una fuente de vitamina A actuando en la neutralización de especies reactiva de oxígeno y nitrógeno.

Los carotenoides son compuestos tetraterpenos lineales, que contienen anillos hexagonales, algunos constituidos por solo por carbono e hidrógeno, y otros por grupos funcionales OH, epóxidos en 5,6 o 5,8, carbonilos, ácidos, ésteres y metóxilos, junto a dobles enlaces conjugados aislados. Se han reportado hasta la fecha aproximadamente unos 600 carotenoides.

El compuesto **1** mostró las siguientes características: peso molecular 601 (M+H). Fragmentos 583 (M+H-18), 565 (M+H-18-18), 547 (M+H-18-18-18), 509 (M+H-92), 491 (M+H-18-92), 393, 221. Los valores fueron corroborados por un espectro de UV/vis en un equipo Thermo spectronic modelo helios Alpha.

Del espectro de masas se constató la presencia de un compuesto de peso molecular 601 (M+H), correspondiente a neoxantina [14-17] (compuesto **1**, figura 1) valores que fueron corroborados por su espectro UV/vis. La figura 2 muestra el espectro de masas de la neoxantina (**1**).

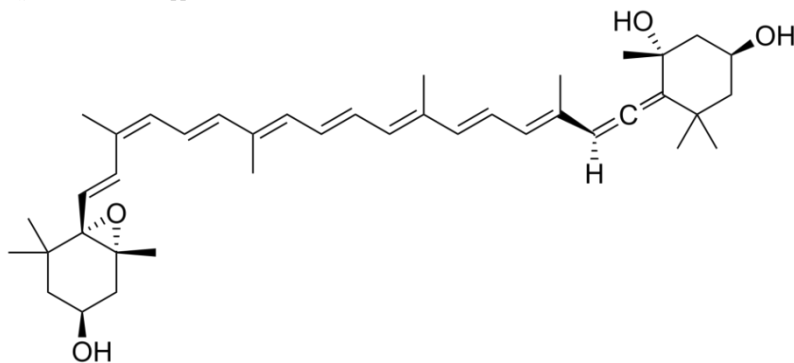


Figura 1: Compuesto 1, neoxantina

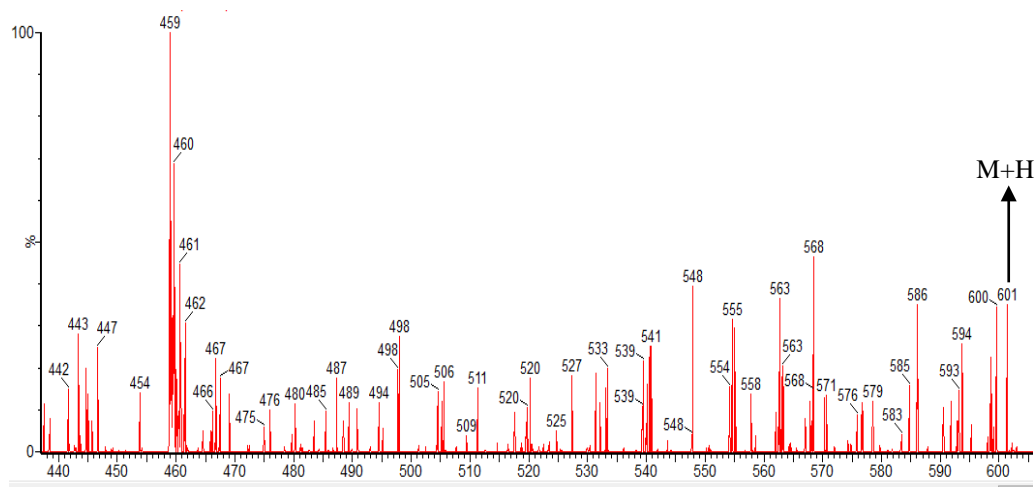


Figura 2. Espectro de masas por electrospray ionization MS/MS de neoxantina (1).

CONCLUSIONES

La técnica de separación, así como la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas resultaron una forma eficiente de separación e identificación de un caroteno. Este es el primer trabajo que muestra la presencia de neoxantina en plantas superiores del género *Inga*.

RECONOCIMIENTOS

A la Lic. Emilia García E. por su valiosa colaboración en la clasificación taxonómica de la especie *Inga ingoides*. Este trabajo fue financiado por fondos IDH, para el Proyecto “Carotenoides en Alimentos de Bolivia”.

REFERENCIAS

1. Killeen, T.J., García, E., Beck., S. Guía de árboles de Bolivia. herbario nacional de Bolivia, **1993**, Missouri botanical Garden. Quipus s.r.l., La Paz, Bolivia.
2. Distasi, L.C., Hiruma,C.A, Gumarães, E.M., Santos, C.M.. **1994**, Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon, *Fitoterapia*, 65 (6), 529-540.
3. Silva, D.F. **2012**, Extrato e Fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/retenção cutânea de formulações tópicas, MSc tesis, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São paulo, Ribeiro Preto, Sao Paulo, Brasil, recuperado de: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-22022013-161509/es.php>. DOI: 10.11606/D.60.2012.tde-22022013-161509



4. Simão Jucá Cruz, M.F., Moyses Pereira, G., Gonçalves Ribeiro, M., Da Silva, A.M., Tinoco, L.W., Pereira da Silva, B., Paz Parente, J. **2016**, Ingasaponin, a complex triterpenoid saponin with immunological adjuvant activity from *Inga laurina*, *Carbohydrate Research*, *420*, 23-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2015.11.008>
5. Rieger, S.C. **2011**, Constituintes químicos e atividades antioxidante, bacteriostática e anti-helmíntica de *Inga marginata* Willd, MSc tesis, Centro de Ciências exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil, recuperado de: <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000170532>
6. Morton, T.C., Zektzer, A.S., Rife, J.P., Romeo, J.T. **1991**, Trans-4-methoxy-pipecolic acid, an amino acid from *Inga paterno*, *Phytochemistry*, *30*(7), 2397-2399. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83658-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83658-8)
7. Furtado, F.B., de Aquino, F.J.T., Nascimento, E.A., Martins, C.M., de Morais, S.A.L., Chang, R., Cunha, L.C.S., Leandro, L.F., Martins, C.H.G., Martins, M.M., da Silva, C.V., Machado, F.C., de Oliveira, A. **2014**, Seasonal Variation of the Chemical Composition and Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from *Inga laurina* (Sw.) Willd, *Molecules*, *19*, 4560-4577; DOI: 10.3390/molecules19044560.
8. Souza, J.N.S., Silva, E.M., Loir, A. Rees, J.F., Rogez, H., Larondelle, Y. **2008**, [Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.011), *Food Chemistry*, *106*, 331-339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.011>
9. Ponce-Palafox, J.T., Arredondo-Figueroa, J.L., Vernon-Carter, E.J. **2004**, Pigmentación de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) con carotenoides de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) en comparación con la astaxantina, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *3*, 219 -225.
10. Meyers, S.P., Estrada, P., Rieque-Marie, M. & Cruz-Suarez, L.E. (**1998**, noviembre). *Papel del Carotenoide Astaxantina en la Nutrición de Especies Acuáticas VI, Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, La Paz, B.C.S., México. Recuperado de: https://www.uan.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/
11. Tischer, Z. **1941**. *Physiol. Chem.*, *267*, 281.
12. Biehler E., Alkerwi, A., Hoffmann, L., krause, E., Guillaume, M., Lair M.L., Bohn, T., **2012**, Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assessment in Luxembourg, *Journal of Food Composition and Analysis*, *25*, 56-65. DOI: 10.1016/j.jfca.2011.07.005
13. Ibieta-Jiménez, G., Bravo, J.A., Quispe Coro, Y., Solís, O., Vila, J.L. **2017**, Synthesis of the new 4'-hydroxy-3'-(3-methyl-2-butenyl)chalcone by microwave-assisted condensation of 4-hydroxy-3-(3'-methyl-2'-butenyl) acetophenone isolated from *Senecio graveolens* and benzaldehyde, *Rev.Bol. Quim.*, *34* (3), 89-103.
14. Neuman, H., Galpaz, N., Cunningham Jr, F.X. Zamir, D., Hirschberg, J., **2014**, The tomato mutation nxd1 reveals a gene necessary for neoxanthin biosynthesis and demonstrates that violaxanthin is a sufficient precursor for abscisic acid biosynthesis, *Plant Journal*, *78*, (1), 80-93. DOI:10.1111/tpj.12451. PMID 24506237
15. Dall'osto, L., Cazzaniga, S., North, H., Marion-Poll, A., Bassi, R. **2007**, The Arabidopsis aba4-1 mutant reveals a specific function for neoxanthin in protection against photooxidative stress, *Plant Cell*, *19* (3), 1048-1064. DOI:10.1105/tpc.106.049114. PMC 1867355. PMID 17351115.
16. Bouvier, F., D'harlingue, A., Backhaus, R.A., Kumagai, M.H., Camara, B. **2000**, Identification of nexanthin synthase as carotenoid cyclase paralog, *European Journal of Biochemistry*, *267* (21), 6346-6352. DOI:10.1046/j.1432-1327.2000.01722
17. North, H.M., de Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., Marion-Poll, A. **2007**, The Arabidopsis ABA-deficient mutant aba4 demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers, *Plant Journal*, *50* (5), 810-824, DOI:10.1111/j.1365-313X.2007.03094.