

Artículo Original

Estudio fitoquímico de las hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec.

Phytochemical study of the leaves from *Espeletia semiglobulata* Cuatrec.

Aparicio Rosa^{1*}, Villasmil Thayded², Peña Alexis², Julio Rojas³, Usubillaga Alfredo¹.

¹Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ²Postgrado Interdisciplinario de Química Aplicada, Facultad de Ciencias. ³Postgrado en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida - República Bolivariana de Venezuela.

Recibido enero 2013 - Aceptado junio 2013

RESUMEN

La *Espeletia semiglobulata* es una planta resinosa característica de los páramos andinos de Venezuela, de la cual se han identificado algunos compuestos de origen diterpénico que son activos biológicamente. En este estudio se presenta el análisis fitoquímico de la fracción ácida y neutra de las hojas con la finalidad de identificar los componentes mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El ácido kaurénico (52 %) fue identificado como el componente mayoritario de la fracción ácida mientras que en la fracción neutra predominó el kaurenal (61 %). Este reporte es importante ya que proporciona un método fácil y reproducible para aislar el ácido kaurénico en grandes cantidades, el cual puede ser utilizado como material de partida para reacciones de hemisíntesis y posterior evaluación de diferentes propiedades biológicas.

PALABRAS CLAVE

Espeletia semiglobulata, *ent*-kaurenos, ácido kaurénico, kaurenal, CG-EM.

ABSTRACT

Espeletia semiglobulata is a resinous plant characteristic of the Andean highlands of Venezuela from where several active diterpene type components have been identified. In this study a phytochemical analysis of acid and neutral fractions from the leaves is being explained with the purpose of identify these components by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Kaurenic acid (52 %) was

identified as the mayor compound from acid fraction whereas kaurenal (61 %) dominated the neutral fraction. This report is very important since facilitate an easy and reproducible method to isolate high amounts of kaurenic acid, that might be used as starting material for further hemisynthesis and biological evaluations.

KEY WORDS

Espeletia semiglobulata, *ent*-kaurenes, Kaurenic acid, kaurenal, GC-MS.

INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia Espeletiinae (Asteraceae) son plantas resinosas características de los páramos andinos de Venezuela, Colombia y Ecuador que crecen por encima de los 2500 m.s.n.m. y son conocidas bajo el nombre popular de frailejones [1]. El género *Espeletia* es uno de los siete géneros que originalmente describió Cuatrecasas para la subtribu Espeletiinae [2]. Posteriormente Cuatrecasas describió un género adicional, *Paramiflos* [3]. Dentro de esta subtribu se encuentra la especie *Espeletia semiglobulata*, de la cual se han identificado algunos compuestos de origen diterpénico que son activos biológicamente. En este sentido, Usubillaga y Capra en 1988 [4] obtuvieron de la fracción ácida de esta planta un 32,9 % de ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico (ácido kaurénico) y 3,1 % de ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-óico y de la fracción neutra aislaron kaurenol (7,1 %), kaurenal (5,4 %), 16 α -hidroxikaurenal (0,8 %) y *n*-nonacosano (45 %) y *n*-heptacosano (31 %) [4].

El ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico, es una sustancia

que posee diversas propiedades biológicas tales como anti-inflamatoria, antipirética, antibacteriana, citotóxica y antiparasitaria [5-8]. En la mayoría de los frailejones estudiados hasta el momento, el componente más abundante de la fracción ácida es el ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-óico (2), denominado ácido grandiflorénico [9]. En 1997 en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes (ULA) se desarrolló un método para analizar los ésteres metílicos del ácido kaurénico y sus derivados mediante cromatografía de gases (CG), que posteriormente se adaptó para analizar mezclas de kaurenos mediante CG acoplada a espectrometría de masas (EM). Este método permitió establecer que la mayoría de los frailejones contenían una mezcla de ácido grandiflorénico y kaurénico, siendo casi siempre el ácido grandiflorénico el más abundante [10,11]. Debido a la importancia biológica del ácido kaurénico y considerando que la *E. semiglobulata* es, hasta el momento, la única especie que contiene muy poco ácido grandiflorénico lo que facilita su purificación, el presente estudio se realizó a fin de determinar la composición relativa de los diferentes derivados kauránicos presentes en la fracción ácida y neutra de las hojas de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las hojas de *E. semiglobulata* 2,0 kg, fueron recolectadas en mayo del año 2010 en el páramo de Piedras Blancas, a 13 Km del Pico de El Águila en la vía de Piñango, Estado Mérida a unos 3100 msnm. La planta fue identificada por el Ing. Juan Carmona. Un voucher del espécimen (AU 30) fue depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA.

Obtención de la fracción ácida y neutra. Las hojas secas y molidas (640 g) se extrajeron con una mezcla de hexano:éter dietílico (3:1, v/v) a temperatura ambiente. Este extracto se agitó con una solución 0,5 molar de hidróxido de sodio (NaOH) para formar las sales sódicas de los ácidos presentes. Se separó la fase acuosa que se acidificó mediante adición de ácido clorhídrico (HCl) hasta pH 3,0 y luego se extrajo con *n*-hexano para recuperar los ácidos libres. Se evaporó el hexano a presión reducida obteniéndose 18,0 g de fracción ácida. Por otra parte, la fracción neutra se evaporó y se obtuvo un residuo de 28,0 g.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Una alícuota (5 mg) de la fracción ácida fue sometida a metilación con diazometano, generado *in*

situ, en éter dietílico [12,13]. Las muestras fueron analizadas por CG-EM utilizando un equipo Hewlett PARCHARD (HP) modelo 5973. Se empleó una columna capilar HP5 MS (5 % fenil, 95 % metilpolisiloxano) de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, con un espesor de película de 0,25 μ m. Se inició a una temperatura de 250 °C, luego se aplicó un calentamiento a razón de 5 °C/min hasta una temperatura final de 300 °C. La temperatura de la interface cromatógrafo-espectrómetro se mantuvo a 280 °C; la cámara de ionización a 230 °C, y cuadrupolo a 150 °C. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de 34 m/s. El análisis se realizó a 70 eV; en un rango de masas de 40-500 uma, a una velocidad de 3,9 espectros/segundo. Se inyectó 1,0 μ L de la solución con reparto de 1:50 (v/v). Los compuestos se identificaron mediante comparación de los tiempos de retención y espectros de masas con patrones existentes en el laboratorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis por CG-EM de la fracción ácida metilada con diazometano, permitió la identificación y cuantificación de nueve compuestos, siendo el mayoritario el ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico (ácido kaurénico) (1a) con un 52 %, los demás componentes ácidos oscilaron entre 0,59 % y 13,3 % (Figura 1, Tabla 1).

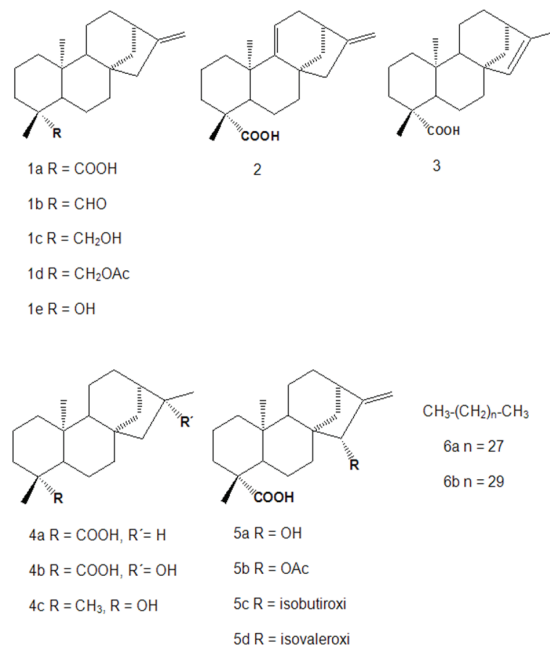


Fig. 1. Estructura molecular de *ent*-kaurenos e hidrocarburos aislados de las hojas de *E. semiglobulata* Cuatrec.

TABLA 1
Componentes identificados de la fracción ácida de
E. semiglobulata Cuatrec.

N°	T _R (Min)	% de área	Componentes
1	3,39	2,0	Ácido <i>ent</i> -kaur-9(11)-16-dien-19-óico (ácido grandiflorénico) (2)
2	3,68	3,0	Ácido <i>ent</i> -kaur-15-en-19-óico. (ácido isokaurénico) (3)
3	4,07	52,0	Ácido <i>ent</i> -kaur-16-en-19-óico (ácido kaurénico) (1a)
4	5,02	9,0	Ácido kauránico (4a)
5	5,82	5,2	Ácido 16 α -hidroxi- <i>ent</i> -kauran-19-óico (4b)
6	6,19	5,4	Ácido 15 α -hidroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-óico (5a)
7	7,48	0,6	Ácido 15 α -acetoxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-óico (5b)
8	8,62	2,0	Ácido 15 α -isobutiroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-óico (5c)
9	9,97	13,3	Ácido 15 α -isovaleroxi- <i>ent</i> -kaur-16-en-19-óico (5d)

Por otra parte, en la fracción neutra se logró la identificación de 7 compuestos, siendo los más abundantes el kaurenol (1b, 61 %) y el kaurenol (1c, 30 %). Además se identificó el acetato de kaurenol (1d, 0,1 %), compuesto que fue aislado de los tallos de *Espeleptiosis guacharaca* por Bolhman y col. en 1980 [14] (Figura 1, Tabla 2).

TABLA 2
Componentes identificados de la fracción neutra de
E. semiglobulata Cuatrec.

N°	T _R (min)	% de área	Componente
10	3,38	4,0	Ruilopeziol (1e)
11	3,67	3,0	16-hidroxikaurano (4c)
12	3,77	61,0	Kaurenol (1b)
13	4,25	30,0	Kaurenol (1c)
14	4,60	0,1	Acetato de kaurenol (1d)
15	6,20	0,5	Heptacosano (6a)
16	10,50	0,5	Nonacosano (6b)

Los patrones de ácido kaurénico (1a), kaurenol (1b), kaurenol (1c), y ácido 15 α -hidroxi-*ent*-kaur-16-en-19-óico (5a) coinciden con los obtenidos de la misma *E. semiglobulata* de acuerdo a los resultados reportados por Usubillaga y Capra en 1988 [4]. Por su parte, el ácido grandiflorénico se obtuvo de *Coespeletia timotensis* [15] mientras que el acetato de kaurenol (1d) se obtuvo mediante acetilación del kaurenol [16] y los ácidos *ent*-kauránico (4a) y 15 α -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-19-óico (5b) se obtuvieron de la *Espeletiopsis angustifolia* [17]. Los ácidos 15 α -isobutiroxi-*ent*-kaurénico (5c) y 15 α -isovaleroxi-*ent*-kaur-16-en-19-óico (5d) se obtuvieron de la *Coespeletia spicata* y *Ruilopezia floccosa*, respectivamente [18]. El ruilopeziol (1e) fue aislado de la *Espeletia nana* [19], el

16 α -hidroxikaurano (4c) se obtuvo mediante reducción tipo Huang-Minlon del 16 α -hidroxikauran-19-al [20] y el ácido isokaurénico (3) se obtuvo de la *Espeletia tenore* [21].

CONCLUSIONES

En el presente estudio se establece que el ácido kaurénico es el ácido más abundante en *E. semiglobulata*, encontrándose en presencia de un bajo porcentaje de ácido grandiflorénico lo que facilita la obtención de ácido kaurénico puro, sustancia valiosa por sus propiedades biológicas, además se lograron identificar otros siete ácidos kaurénicos. Por otra parte, de la fracción neutra se lograron identificar cinco componentes de tipo *ent*-kaurenol que representan el 98,1 %, y dos ceras de cadena larga.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) a través del proyecto FA-509-11-08A.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Badillo VM. Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. *Ernstia*. 2001; 11: 147-215.
- [2] Cuatrecasas JA. New subtribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. *Phytologia*. 1976; 35: 43-61.
- [3] Cuatrecasas JA. New genus of the Compositae: *Paramiflos* (Espeletiinae) from Colombia. *Proc Biol Soc. Washington*. 1995; 108: 748-750.
- [4] Usubillaga A, Capra MC. Chemical constituents of *Espeletia semiglobulata*. *Fitoterapia*. 1988; 59: 383-384.
- [5] Ghisalberti EL. The biological activity of naturally occurring kaurenol diterpenes. *Fitoterapia*. 1997; 68: 303-325.
- [6] Sosa-Sequera M, Suarez O, Dalo N. Kaurenol acid: An *in vivo* experimental study of its anti-inflammatory and antipyretic effects. *Indian J Pharmacol*. 2010; 42: 293-296.
- [7] Hueso-Falcón I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro-Luis J, Ravelo A, Estévez-Braun A, et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of the *ent*-kaurenol derivatives. *Eur J Med Chem*. 2011; 46: 1291-1305.
- [8] Cordero Y, Corao GM, Cova JA, Usubillaga A. Effect of some *ent*-kaurenols on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat Prod Comm*. 2012; 7: 563-564.

[9] Piozzi F, Sprio V, Passannanti S, Mondelli R. Struttura dell'acido grandiflorolico. *Gaz Chim Ital.* 1968, 98: 907-910.

[10] Vilorio E, Rojas L, Usubillaga A. Analysis of kaurenic acid methyl esters by gas chromatography. *J High Resol Chromatogr.* 1997; 20: 50-51.

[11] Ibáñez J. Estudio de la composición del aceite esencial y de la resina en el ciclo vital de la *Espeletia schulzii*, *Coespeletia moritziana*, *Ruilopezia atropurpurea*, y de un híbrido. [Trabajo de grado] Mérida: Universidad de Los Andes; 2004.

[12] Haitman W, Roll L. *Organic Synthesis, Collective Vol II.* John Wiley and Sons, New York; 1957, p 461-464.

[13] Arndt F. *Organic Synthesis. Collective Vol II.* John Wiley and Sons, New York; 1957, p 165.

[14] Bohlmann H, Suding J, Cuatrecas JA, Robinson H, King RM. Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from *Espeletiopsis* species. *Phytochemistry.* 1980, 19: 2399-2403.

[15] Pérez-Rodríguez N. Estudio de los componentes de la *Espeletia timotensis*. [Tesis

Doctoral] Mérida: Universidad de Los Andes; 1972.

[16] Baptista J, Monsalve M, Alonso ME, Ávila JL, Usubillaga A. Ensayo de actividad antialimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del *ent*-kaureno. *Ciencia.* 2007; 15: 248-258.

[17] Meccia G, Quintero P, Rojas LB, Usubillaga A, Carmona A. Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de los Andes venezolanos. *Av Quím.* 2010; 5: 45-49.

[18] Usubillaga A, Romero M, Aparicio R. Kaurenic acid in *Espeletiinae*. *Acta Hort.* 2003; 597: 129-130.

[19] Peña A, Alarcón L, Baptista J, Aparicio R, Villasmil T, Usubillaga A. A Phytochemical analysis of *Espeletia nana* Cuatrec. a midget *Espeletiinae* from páramo Ortiz, Venezuela. *Av Quím.* 2012; 7: 189-194.

[20] Usubillaga A, Nakano T. Kaurenoid diterpenes in *Ruilopezia margarita*. *Planta Med.* 1979; 35: 331-338.

[21] Usubillaga A, Morales A. Diterpenos kaurénicos en la *Espeletia tenore*. *Rev Latinoamer Quím.* 1970; 1: 128-132.