

Artículo original

Estudio fitoquímico y actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.

Phytochemical study and antioxidant activity of the extracts from aerial parts of *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.

Mogollón José Ángel¹, Rondón María Eugenia^{2*}, Morales Antonio¹, Contreras Billmary Zuleyma¹.

¹Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, C.P. 5101, Mérida- República Bolivariana de Venezuela. ²Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, C.P. 5101, Mérida- República Bolivariana de Venezuela.

Recibido febrero 2016 - Aceptado junio 2016

RESUMEN

Euphorbia laurifolia Juss. ex Lam., (syn *Euphorbia latazi* Kunth) es un arbusto que presenta abundante látex de color blanco y es conocido popularmente como “Lechero”. El estudio fitoquímico de las partes aéreas de *E. laurifolia* permitió aislar lanosterol (1), latazienona (2), β -sitosterol-3-*O*-glucósido (3), y el flavonoide quercitrina (4). El mayor contenido de fenoles y flavonoides se encontró en el extracto en acetato de etilo en una proporción de $36,13 \pm 0,28$ μ g EAG/mg (μ g equivalentes de ácido gálico/mg extracto seco) y $271,23 \pm 2,40$ μ g EQ/mg (μ g equivalentes de quercetina/mg extracto seco), respectivamente. Además, este mismo extracto mostró el mayor poder reductor en todas las concentraciones ensayadas. La capacidad secuestrante de radicales libres DPPH de los extractos osciló entre 51,66 % y 96,46 %, siendo el valor más alto calculado para el extracto crudo principal, el cual también presentó el mayor poder antirradicalario (ARP) $73,16 \pm 5,53$ mL/mg, casi tres veces mayor al del ácido ascórbico empleado como control. Hasta el momento sólo se han reportado dos estudios fitoquímicos del látex de *E. laurifolia* (en un estudio nominada como *E. latazi* Kunth), siendo éste el primer estudio fitoquímico de las partes aéreas y de la actividad antioxidante de esta especie.

PALABRAS CLAVE

Euphorbia laurifolia, terpenos, latirano, flavonoides, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Euphorbia laurifolia Juss. ex Lam., (syn *Euphorbia latazi* Kunth) is a shrub with abundant white latex. It is popularly known as “Lechero”. Phytochemical investigation of *E. laurifolia* aerial parts resulted in the isolation and identification of lanosterol (1), latazienone (2), β -sitosterol-3-*O*-glucoside (3), and the flavonoid quercitrin (4). The highest phenolic and flavonoid contents were found in ethyl acetate extract at 36.13 ± 0.28 μ g GAE/mg (μ g gallic acid equivalents/mg of dry extract) and 271.23 ± 2.40 μ g QE/mg (μ g quercetine equivalents/mg of dry extract), respectively. The free radical scavenging capability DPPH of extracts ranged between 51.66 % and 96.46 %, being the highest value calculated for the main crude extract, which also presented the highest antiradical power (ARP) 73.16 ± 5.53 mL/mg, three times greater than of the ascorbic acid used as the positive control which is 27.18 ± 2.41 mL/mg. So far, only two phytochemical studies were reported of the latex from *E. laurifolia* (in a study named as *E. latazi* Kunth) and this is the first phytochemical study of the aerial parts and the antioxidant activity of this species.

*Correspondencia al autor: rondonr@ula.ve

KEY WORDS

Euphorbia laurifolia, terpenes lathyrane, flavonoids, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

La especie *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam, pertenece a uno de los géneros de la familia Euphorbiaceae, con una amplia distribución geográfica en ambos hemisferios, y comprende alrededor de 2000 especies [1]. Estas plantas se caracterizan por presentar látex de color blanco [2], y tradicionalmente se emplean en el tratamiento de afecciones de la piel, gonorrea, migraña y parásitos intestinales [3]; además, poseen actividad como antimicrobianos [4,5], antioxidante [6,7]; analgésicos-antipiréticos [8,9], citotóxicos, antialérgicos y antidiarreicos, entre otros [10].

A partir del estudio fitoquímico de algunas especies del género *Euphorbia*, se han identificado un gran número de compuestos interesantes desde el punto de vista biológico, tales como compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas, entre otros), esteroides, esfingolípidos, cerebrósidos, triterpenos y diterpenos; siendo estos últimos, la clase de compuestos en los que los investigadores han centrado su mayor atención en la última década [10,11]. Hasta la fecha se han reportado alrededor de 400 diterpenos aislados del género *Euphorbia* con 23 tipos de esqueletos diferentes, entre los que destacan los casbanos, mirsinanos, dafnanos, tiglinanos, abietanos; jatrofanos y latiranos [10]. Algunos compuestos de este último tipo han mostrado poseer una excelente actividad como moduladores de la resistencia a fármacos antineoplásicos, ya que actúan como potentes inhibidores de la glicoproteína-P (Gp-P) [12-14].

La *Euphorbia laurifolia* Juss. ex. Lam. (syn *Euphorbia latazi* Kunth), se distribuye en Colombia, Ecuador, Guyana, Perú y Venezuela, donde su distribución se restringe al Estado Mérida en los Andes Venezolanos. Esta especie crece sobre los 2.580 msnm, como arbustos suculentos que presentan fruto trilocular [15], y normalmente se le consigue como cercas vivas a orillas de carretera.

Las investigaciones fitoquímicas y biológicas sobre *E. laurifolia* son escasas, y de hecho hasta la fecha solo se han reportado dos trabajos en la literatura científica; en un caso, se reportó la actividad antiviral de dos diterpenos tipo latirano

aislados a partir del látex, los cuales disminuyen la latencia viral en el Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [16]. Adicionalmente, en el año 2005, este grupo de investigación reportó el aislamiento de la latazienona, un nuevo diterpeno tipo latirano obtenido a partir del látex [17]. En esta ocasión, se presenta el estudio fitoquímico y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios de las partes aéreas (ramas y hojas) de *E. laurifolia*, así como el análisis de su posible actividad antioxidante. Este es el primer reporte sobre el estudio fitoquímico de las partes aéreas de esta especie así como el de su actividad antioxidante.

MATERIAL Y MÉTODOS

Procedimiento General. Los puntos de fusión fueron determinados sin corrección en un aparato Fisatom 430D. Los espectros de IR fueron determinados en un espectrómetro Perkin-Elmer 1320. Los espectros de RMN fueron hechos en un espectrómetro Bruker Advance DRX-400 (RMN-¹H 400 MHz; RMN-¹³C 100,61 MHz), usando CDCl₃ o MeOD como solvente [Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EE.UU.]. Los espectros de masas fueron tomados en un equipo Varian modelo Saturno 2000. Las absorbancias fueron medidas en un espectrómetro UV/visible (Spectronic GENESYS 10 Bio). Los procedimientos para el aislamiento se desarrollaron por cromatografía en columna sobre gel de sílice (Merck 9385), y las cromatografías sobre capa fina empleando placas de gel de sílice con indicador fluorescente F254 (Merck 5554) y visualizadas bajo luz UV y empleando una solución de H₂SO₄ al 10 % o vainillina como revelador, seguido de calentamiento. El radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), ferrocianuro de potasio, ácido tricloroacético, cloruro férrico, quercetina, ácido gálico y reactivo de Folin-Ciocalteu se obtuvieron de Sigma-Aldrich® (EE. UU.); buffer de fosfato (fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico dihidratado) carbonato de sodio, ácido ascórbico, tricloruro de aluminio y los solventes n-hexano, acetato de etilo y metanol fueron obtenidos de Merck (Darmstadt Germany).

Material botánico. Las partes aéreas de *E. laurifolia* (2,5 Kg) se recolectaron en el páramo de Gavidia, Municipio Rangel a 3.200 msnm en el Estado Mérida-Venezuela en Noviembre de 2.013. La muestra fue identificada por el Ing. For. Juan Carmona y se depositó bajo el número de Voucher

MER-01 en el Herbario “Prof. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Extracción y aislamiento de los componentes químicos. El material vegetal seco y molido (partes aéreas \cong 741,0 g) se sometió a un proceso de maceración con metanol a temperatura ambiente por 72 horas. El solvente se evaporó hasta sequedad y el residuo resultante (extracto crudo: Ext. crudo) se suspendió en una mezcla de metanol-agua y se extrajo sucesivamente con solventes en orden de polaridad creciente (*n*-hexano, acetato de etilo y metanol). La fracción hidroalcohólica se sometió a liofilización previa concentración del metanol. Cada uno de las fracciones se llevaron hasta sequedad y los extractos secos obtenidos se conservaron en envases herméticamente tapados hasta su utilización en los ensayos de actividad y/o separación cromatográfica. El extracto en *n*-hexano (8,0 g) se sometió a cromatografía empleando columna de gel de sílice y usando mezclas de *n*-hexano/AcOEt en orden de polaridad creciente (1:0 hasta 0:1) De acuerdo con la cromatografía en capa fina se obtuvieron 9 fracciones diferentes (F1-F9). El residuo obtenido de las fracciones eluidas con *n*-hexano/AcOEt 9:1 y 4:1 (F3; 2,96 g) fue sometido nuevamente a cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando mezclas de *n*-hexano/AcOEt (1:0 hasta 0:1). De acuerdo a las observaciones hechas por cromatografía de capa fina, se reunieron en 4 fracciones diferentes (Ra-Rd). De la fracción Ra se obtuvo el triterpeno lanosterol (1.450,0 mg). De las fracciones eluidas con *n*-hexano/AcOEt 4:1 (Rb) se obtuvo un compuesto el cual fue purificado por cristalización con metanol resultando ser el diterpeno latazienona (2, 23,0 mg). De las fracciones eluidas con *n*-hexano/AcOEt 1:9 se obtuvo el β -sitosterol-3-*O*-glucósido (3.360,0 mg).

El extracto en acetato de etilo (1,7 g) se sometió a cromatografía en columna sobre gel de sílice usando mezclas AcOEt/MeOH (1:0 hasta 0:1). De las fracciones eluidas con AcOEt/MeOH 4:1, se obtuvo un compuesto que fue purificado por cristalización con metanol, identificado como el flavonoide glicosilado quercitrina (4, 36,0 mg).

Método de la actividad secuestrante de radicales libres de DPPH. El efecto secuestrante de radicales libres de DPPH de los extractos, se estimó utilizando el método descrito por Díaz *et al.*, [18]. Se preparó una solución metanólica de DPPH (6×10^{-2} mM). 2,8 mL de esta solución se mezcló con 0,2

mL de cada extracto en metanol a una concentración de 1,0 mg/mL. La mezcla de reacción se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min. La absorbancia de la mezcla se midió a 517 nm. Se utilizó como patrón de referencia una solución metanólica de ácido ascórbico (0,176 mg/mL). El porcentaje de inhibición (% I) de radicales libres de DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% I = \left(\frac{Abs_{DPPH} - Abs_{extracto}}{Abs_{DPPH}} \right) * 100$$

En donde AbsDPPH es la absorbancia de la solución metanólica de DPPH, y Abs_{extracto} es la absorbancia de la mezcla de la solución metanólica de DPPH mas la solución metanólica del extracto.

Determinación de la concentración efectiva.

Las muestras que alcanzaron un porcentaje de inhibición superior a 50 %, fueron evaluadas a diferentes concentraciones (5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 y 0,005 mg/mL) y se aplicó la metodología descrita anteriormente. La concentración requerida para obtener el 50 % de la capacidad máxima para secuestrar radicales libres (concentración efectiva 50, EC₅₀) fue calculada por regresión lineal. Por razones de claridad, los resultados son expresados en términos de 1/EC₅₀ o poder antirradicalario (ARP); a mayor valor de ARP, mayor será la eficiencia del extracto como antioxidante [19].

Determinación del contenido de fenoles totales. El contenido fenólico total de cada extracto se determinó por el método de Folin-Ciocalteu [20]. Una alícuota de 50 μ L de cada extracto en metanol a 0,5 mg/mL se mezcló con 450 μ L de agua destilada y 250 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu (0,2 N en agua). Esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 min y después se añadieron 1.250 μ L de una solución de carbonato de sodio (7,5 % en agua). Después de 2 horas de incubación, se midieron las absorbancias a 760 nm frente a un blanco (agua + metanol). Se realizó una curva estándar de calibración usando ácido gálico (0-32 μ g/mL) en intervalos de 4 μ g/mL. Los resultados se expresan como μ g equivalentes de ácido gálico (EAG)/mg de extracto seco.

Determinación del contenido total de flavonoides. El contenido total de flavonoides se estimó de acuerdo con el método modificado por Dowd y descrito por Lamien-Meda [20]. Una solución metanólica (1,0 mL) de cada extracto a 0,5 mg/mL se mezcló con una solución (1,0 mL)

de tricloruro de aluminio (AlCl_3) en metanol (2,0 %). La absorbancia se leyó a 415 nm después de 10 min, frente a una muestra en blanco que consistió en una mezcla de metanol (1,0 mL) y el extracto (1,0 mL) sin AlCl_3 . Se realizó una curva estándar de calibración utilizando quercetina (0-32 $\mu\text{g/mL}$). Los resultados se expresan como μg equivalentes de quercetina (EQ)/mg de extracto seco.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó con los programas Excel (Microsoft, Redmond, WA, EE.UU.) y SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Con el fin de determinar la relación estadística de las diferencias de la actividad antioxidante, se utilizó la prueba de Student para la comparación entre dos variables. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para la comparación de más de dos variables. Se aplicó una prueba de correlación bivariada de Pearson para calcular los coeficientes de correlación lineal (r) entre el contenido fenólico total y de flavonoides de cada extracto y actividad

antioxidante. Todos los resultados se expresaron como valores globales de media y desviación (SD) de tres mediciones paralelas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos lanosterol (1), latazienona (2), β -sitosterol-3-*O*-glucósido (3) y quercitrina (4) (Fig. 1) se reportan por primera vez para las partes aéreas de *E. laurifolia*. Previamente, nuestro grupo de investigación reportó el aislamiento del lanosterol y del diterpeno latazienona a partir del látex de esta especie [17], siendo en esa ocasión descrito por primera vez en la literatura el diterpeno latazienona. Las estructuras químicas de estos compuestos fueron elucidadas por técnicas espectroscópicas (IR, RMN unidimensional y bidimensional y EM). Todos los datos espectroscópicos, así como los puntos de fusión fueron comparados con los de la literatura [17,21-23].

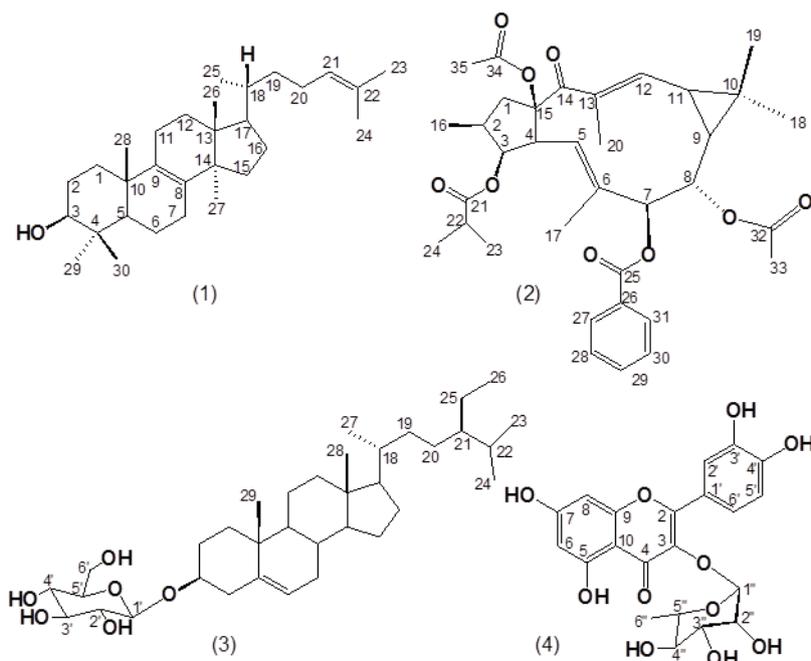


Fig. 1. Estructura química de los compuestos aislados de las partes aéreas de *E. laurifolia*.

Actividad Antioxidante. Los ensayos de secuestro de radicales libres de DPPH de los extractos de *E. laurifolia* (Ext Crudo: extracto crudo; Ext Hex: extracto en hexano; Ext AcEtO: extracto en acetato de etilo y Ext MeOH: extracto en metanol) y de la quercitrina (4) fueron expresados como % de capacidad secuestrante de radicales libres (% CSRL)

(Fig. 2); ésta osciló entre 51,66 % y 96,46 % siendo el % CSRL a 1000 $\mu\text{g/mL}$ más alto para el Ext Crudo en $96,46 \pm 0,34$ %, mientras que el menor % CSRL lo mostró el Ext Hex en $51,66 \pm 0,59$ %.

Concentración efectiva como poder antirradicalario. La actividad antioxidante se expresó como el poder antirradicalario (ARP) (Tabla 1)

en las muestras con un % CSRL superior al 50 % (Fig. 2). Los resultados de ARP obtenidos por regresión lineal mostraron una fuerte correlación ($r^2 \geq 0,92$), donde los valores más altos de ARP indicaron mayor poder antioxidante. Los valores medidos de ARP, variaron desde 0,95 mL/mg hasta 73,16 mL/mg (Tabla 1). En general, hubo una diferencia significativa entre los extractos, la quercitrina y el ácido ascórbico como control ($p < 0,05$). Sin embargo, la actividad antioxidante del extracto crudo fue casi tres veces mayor que la del ácido ascórbico, el cual actúa como control positivo en el ensayo, revelando el alto poder antioxidante de este extracto.

Correlación entre la concentración efectiva como poder antirradicalario y el contenido de fenoles y flavonoides. El contenido de fenoles totales en los extractos se determinó según la ecuación obtenida a partir del gráfico de ácido gálico estándar ($Y=0,0243*X+0,0064$; $R^2=0,9988$) y variando desde 1,76 hasta 36,13 μg EAG/mg de extracto seco (Tabla 1). Los resultados se expresaron en μg de ácido gálico equivalente a 1 mg de extracto seco. Se detectó el nivel más alto de compuestos fenólicos en el extracto de acetato de etilo (Ext AcEtO) en $36,13 \pm 0,28$ μg EAG/mg de extracto seco, mientras que el extracto en hexano

(Ext Hex) mostró el menor contenido en $1,76 \pm 0,11$ μg EAG/mg de extracto seco. El contenido de flavonoides totales se determinó según la ecuación obtenida a partir del gráfico de quercetina estándar ($Y=0,0227*X+0,0294$; $R^2=0,995$). Los resultados se expresaron en μg de quercetina equivalentes a 1 mg de extracto seco. El mayor contenido de flavonoides se encontró en el extracto de acetato de etilo (Ext AcEtO) en $271,23 \pm 2,40$ μg EQ/mg de extracto seco, mientras que el extracto metanólico (Ext MeOH) mostró el más bajo contenido en $29,72 \pm 0,25$ μg EQ/mg de extracto seco (Tabla 1).

En general, hubo una mayor proporción del contenido de flavonoides que de fenoles en todos los extractos analizados (Tabla 1). Este resultado difiere de los revisados en la literatura para otras especies del género *Euphorbia* en los que el contenido de fenoles es marcadamente mayor al de flavonoides, tal es el caso de *E. hirta* (fenoles 206,17 – 67,70 μg EAG/mg; flavonoides 37,97 – 24,12 μg EQ/mg) [7]. *E. helioscopia* (fenoles 51,49 – 4,80 μg EAG/mg; flavonoides 11,38-1,69 μg EQ/mg) [25]; *E. acanthothamnus* (fenoles 176,01 – 6,26 μg EAG/mg; flavonoides 33,72-4,66 μg EQ/mg) [26]; *E. royleana* (fenoles 63,68 – 30,65 μg EAG/mg; flavonoides 47,47-18,89 μg EQ/mg) [27].

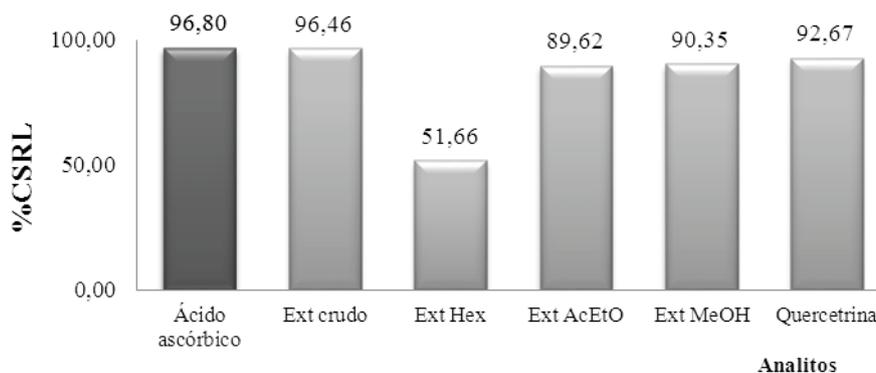


Fig. 2. % CSRL de los analitos ensayados de *E. laurifolia* y del ácido ascórbico como patrón.

Los resultados no revelaron correlación entre la actividad antioxidante y el contenido de flavonoides y fenoles de los extractos ($p > 0,05$), por lo que la actividad antioxidante de los extractos pudiera no depender del contenido de fenoles y flavonoides presentes en ellos por lo que posiblemente podría ser atribuida a la presencia de otros compuestos. Esto lo corrobora el comportamiento del extracto en

acetato de etilo, el cual reveló la mayor proporción de flavonoides en una proporción de $271,23 \pm 2,40$ μg EQ/mg y fenoles $36,13 \pm 0,28$ μg EAG/mg, sin embargo; tuvo un poder antioxidante relativamente bajo con un valor de ARP de $3,70 \pm 0,10$.

Poder reductor. La actividad antioxidante de los extractos y de la quercitrina fue complementada por el cálculo de su capacidad para reducir Fe^{+3} a

Fe^{+2} , monitoreado por la formación de un complejo coloreado (reacción tipo Fenton). La Figura 3 ilustra el poder reductor de los extractos y de la quercitrina a 1000, 500, 100, 50, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados observados demostraron que el poder reductor de los extractos y la quercitrina fueron dependientes de la concentración, siendo el extracto en acetato de etilo (Ext AcEtO) el que presentó una alta capacidad antioxidante a concentraciones relativamente bajas, caso contrario con el extracto hexánico (Ext Hex) que presentó una baja capacidad antioxidante en comparación con el resto de los extractos y la quercitrina. Es importante señalar que algunos

estudios han demostrado un descenso en la actividad antioxidante de la quercitrina en comparación con la quercetina, lo cual demuestra que ésta actividad está relacionada con la presencia de los grupo hidroxilo libres [28,29]. Todos los flavonoides con hidroxilos libres en posición C-3 y doble enlace entre C-2 y C-3 tienen un alto poder antioxidante. El bloqueo del grupo OH en C-3 por una molécula de ramnosa causa pérdida de la actividad [30]. Esto quedó confirmado al comparar la actividad antioxidante por el método DPPH de la quercitrina (4) aislado de *E. laurifolia* ($16,63 \pm 0,63$) con el reportado en la literatura para la aglicona quercetina ($76,5 \pm 1,7$) [30].

TABLA 1
Poder antirradicalario (ARP) y contenido de fenoles y flavonoides totales de los analitos de *E. laurifolia*.

Analitos	ARP**	Contenido de fenoles totales (μg EAG/mg extracto seco)	Contenido de flavonoides (μg EQ/mg extracto seco)
Ext crudo	$73,16 \pm 5,53$	$14,09 \pm 0,08$	$56,84 \pm 1,30$
Ext Hex	$0,95 \pm 0,03$	$1,76 \pm 0,11$	$39,33 \pm 0,29$
Ext AcEtO	$3,70 \pm 0,10$	$36,13 \pm 0,28$	$271,23 \pm 2,40$
Ext MeOH	$3,30 \pm 0,03$	$19,12 \pm 0,18$	$29,72 \pm 0,25$
Quercitrina	$16,63 \pm 0,63$	NE	NE
Ácido ascórbico	$27,18 \pm 2,41$	NE	NE

Ext crudo: extracto metanólico obtenido por maceración; Ext Hex: extracto hexánico obtenido por extracción líquido-líquido; Ext AcEtO: extracto en acetato de etilo obtenido por extracción líquido-líquido; Ext MeOH: extracto metanólico obtenido por extracción líquido-líquido.

** : Actividad antioxidante en términos de $\text{ARP}=1/\text{CE}_{50}$. EAG: Equivalentes de ácido gálico; EQ: Equivalentes de quercetina. NE: No Ensayado. Data representada como media \pm δ de las tres lecturas independientes.

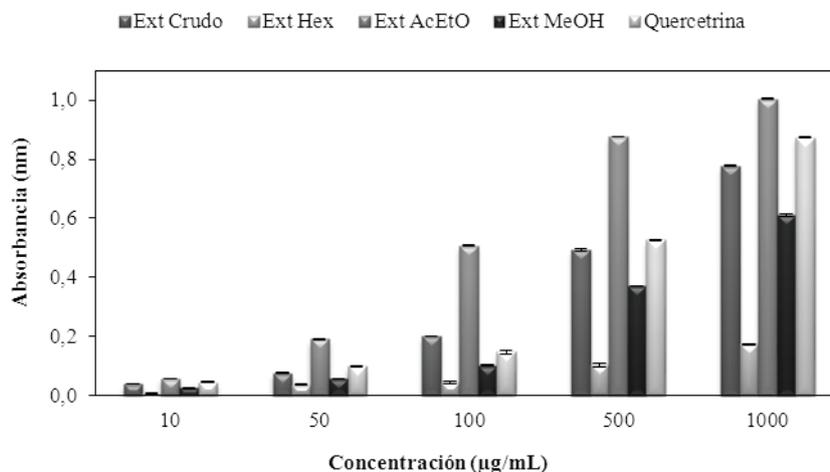


Fig. 2. Poder reductor de los analitos de *E. laurifolia*.

Datos espectrales de los compuestos. *Lanosterol*

(1): p.f: 122-126°C; IR (KBr): ν_{\max} cm^{-1} : 3416, 2935, 1714, 1463, 1055; EM m/z : 426 [M^+]; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 0,69 (3H, s, H-26), 0,81 (3H, s, H-29), 0,87 (3H, s, H-27), 0,96 (3H, d, $J=6,8$ Hz, H-25), 1,00 (3H, s, H-30), 1,25 (2H, m, H-19), 1,60 (3H, s, H-26), 1,68 (3H, s, H-27), 1,91 (2H, m, H-20), 2,05 (1H, d, $J=11,2$ Hz, H-7), 3,24 (1H, dd, $J=4,6, 11,8$ Hz H-3), 5,10 (1H, t, $J=8,33$ Hz, H-21). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 15,41 (-CH₃, C-30), 15,75 (-CH₃, C-18), 17,62 (-CH₃, C-21), 18,26 (-CH₃, C-19), 18,64 (-CH₃, C-26), 19,14 (-CH₂, C-6), 21,01 (-CH₂, C-11), 24,25 (-CH₂, C-23), 24,92 (-CH₃, C-27), 25,71 (-CH₃, C-28), 26,51 (-CH₂, C-12), 27,86 (-CH₃, C-29), 27,96 (-CH₂, C-2), 28,20 (-CH₂, C-7), 29,69 (>CH, C-17), 31,00 (-CH₂, C-15), 31,96 (-CH₂, C-16), 35,60 (-CH₂, C-1), 36,26 (-CH₂, C-22), 36,36 (>CH, C-20), 37,03 (>C<, C-10), 38,84 (>C<, C-4), 44,5 (>C<, C-13), 49,82 (>C<, C-14), 50,41 (>C<, C-5), 79,00 (>CH, C-3), 125,25 (>CH, C-24), 130,89 (>C<, C-25), 134,40 (>C<, C-8, C-9).

Latazienona (2): p.f: 223-226 °C; EM m/z : 608,2437 [M^+], 548 [M^+ -HOAc], 488 [M^+ -2x HOAc], 460 [548-C₃H₇CO]; IR (KBr): ν_{\max} = 2968, 1767, 1654, 1622; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 0,90 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-23), 0,91 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-24), 0,93 (3H, d, $J=7,0$ Hz, H-16), 1,14 (3H, s, H-18), 1,24 (3H, s, H-19), 1,37 (1H, dd, $J=8,5, 11,2$ Hz, H-9), 1,48 (1H, t, $J=13,8$ Hz, H-1 α), 1,67 (3H, s, H-17), 1,66 (1H, m, H-11), 1,86 (3H, s, H-20), 2,02 (3H, s, H-33), 2,08 (1H, m, H-2), 2,11 (3H, s, H-35), 2,23 (1H, spt, $J=7,0$ Hz, H-22), 2,52 (1H, dd, $J=3,9, 11,2$ Hz, H-4), 3,56 (1H, dd, $J=8,1, 14,5$ Hz, H-1 β), 5,03 (1H, d, $J=9,8$ Hz, H-7), 5,08 (1H, t, $J=3,7$ Hz, H-3), 5,44 (1H, t, $J=10,9$ Hz, H-8), 5,92 (1H, dd, $J=1,7, 11,2$ Hz, H-5), 6,72 (1H, d, $J=12,9$ Hz, H-12), 7,46 (2H, dd, $J=7,9, 8,1$ Hz, CH-Ar), 7,57 (1H, t, $J=7,4$ Hz, CH-Ar), 7,89 (2H, t, $J=7,2$ Hz, CH-Ar). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 12,2 (-CH₃, C-20), 13,7 (-CH₃, C-24), 16,4 (-CH₃, C-23), 18,2 (-CH₃, C-19), 18,5 (-CH₃, C-17), 18,9 (-CH₃, C-16), 21,1 (-CH₃, C-33), 21,2 (-CH₃, C-35), 25,1 (>C<, C-10), 28,8 (>CH, C-11), 29,8 (-CH₃, C-18), 33,6 (>CH, C-9), 34,1 (>CH, C-22), 38,4 (>CH, C-2), 44,1 (>CH₂, C-1), 50,4 (>CH, C-4), 72,9 (>CH, C-8), 78,5 (>CH, C-7), 79,6 (>CH, C-3), 94,4 (>C<, C-15), 123,0 (>CH, C-5), 128,4 (>CH, C-28, C-30), 129,6 (>CH, C-27, C-31), 133,1 (>CH, C-29), 133,5 (>C<, C-13, C-26), 138,7 (>C<, C-6), 143,5 (>CH, C-12), 165,2 (>C=O, C-25), 169,6 (>C=O, C-34),

170,2 (>C=O, C-32), 175,1 (>C=O, C-21), 194,5 (>C=O, C-14).

β -sitosterol-3-O-glucósido (3): p.f: 285-288 °C. EM m/z : 413 [M^+ -C₆H₁₁O₅], 396 [aglicona-OH], 164 [C₆H₁₂O₅]; RMN ^1H (400 MHz, C₅D₅N) δ_{H} : 0,65 (3H, s, H-18), 0,86 (3H, d, $J=6,0$ Hz, H-21), 0,87 (3H, t, $J=6,8$ Hz, H-26), 0,88 (3H, d, $J=6,0$ Hz, H-9), 0,92 (3H, s, H-19), 5,04 (1H, d, $J=7,6$ Hz, H-1'), 5,33 (1H-H6). RMN ^{13}C (100 MHz, C₅D₅N) δ_{C} : 11,97 (-CH₃, C-29), 12,15 (-CH₃, C-28), 19,00 (-CH₃, C-26), 19,21 (-CH₃, C-23), 19,41 (-CH₃, C-24), 19,86 (-CH₃, C-27), 21,27 (-CH₂, C-11), 23,39 (-CH₂, C-25), 24,50 (-CH₂, C-15), 26,40 (-CH₂, C-20), 28,52 (-CH₂, C-16), 29,47 (>CH, C-22), 30,24 (-CH₂, C-2), 32,06 (>CH, C-8), 32,16 (-CH₂, C-7), 34,21 (-CH₂, C-19), 36,38 (>CH, C-18), 36,91 (>C<, C-13), 37,47 (-CH₂, C-1), 39,33 (-CH₂, C-4), 39,95 (-CH₂, C-12), 42,48 (>C<, C-10), 46,04 (>CH, C-21), 50,34 (>CH, C-9), 56,25 (>CH, C-17), 56,83 (>CH, C-14), 62,83 (-CH₂, C-6'), 71,68 (>CH, C-4'), 75,30 (>CH, C-3'), 78,10 (>CH, C-3), 78,43 (>CH, C-2'), 78,57 (>CH, C-5'), 102,56 (>CH, C-1'), 121,88 (>CH, C-6), 140,90 (>C<, C-5).

Quercetrina (4): p.f 202-204°C; EM m/z 448 [M^+]; IR (KBr) ν_{\max} : 3364 (OH), 1736 (C=O), 1604 (C-H aromático); RMN ^1H (400 MHz, MeOD) δ_{H} : 0,92 (3H, d, $J=5,9$ Hz, CH₃-Ramn), 3,33 (1H, t, $J=9,5$ Hz, H-4''), 3,40 (1H, m, H-5''), 3,74 (1H, dd, $J=3,4, 9,5$ Hz, H-3''), 4,21 (1H, dd, $J=1,7, 3,4$ Hz, H-2''), 5,33 (1H, d, $J=1,7$ Hz, H-1'), 6,19 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-6), 6,36 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-8), 6,9 (1H, d, $J=8,3$ Hz, H-5'), 7,29 (1H, dd, $J=2,0, 8,3$ Hz, H-6'), 7,32 (1H, d, $J=2,0$ Hz, H-2'). RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) δ_{C} : 17,6 (-CH₃, C-6''), 72,1 (>CH, C-2''), 71,9 (>CH, C-5''), 72,0 (>CH, C-3''), 72,2 (>CH, C-4''), 94,7 (>CH, C-8), 99,8 (>CH, C-6), 103,5 (>CH, C-1''), 105,9 (>C<, C-10), 116,4 (>CH, C-5'), 116,9 (>CH, C-2'), 122,8 (>CH, C-6'), 122,9 (>C<, C-1'), 136,2 (>C<, C-3), 146,4 (>C<, C-4'), 149,8 (>C<, C-3'), 158,5 (>C<, C-2), 159,3 (>C<, C-9), 163,0 (>C<, C-5 y C-7), 179,6 (>C=O, C-4).

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico realizado a las partes aéreas de *E. laurifolia* colectada en Los Andes venezolanos, permitió el aislamiento del diterpeno latazienona y del flavonoide glicosilado quercitrina, los otros dos isoprenoides aislados (lanosterol y β -sitosterol 3-O-glucósido) habían sido anteriormente

encontrados en el látex. Además, mostró compuestos comunes para otras especies del mismo género. También se observó una mayor proporción de flavonoides que de fenoles en todos los extractos evaluados, siendo el extracto en acetato de etilo el que mostró una mayor presencia de los mismos. No se evidenció una relación entre el poder antirradicalario y el contenido de flavonoides y fenoles, ya que el extracto de acetato de etilo mostró un débil poder antirradicalario. Sin embargo, se encontró asociación entre el poder reductor y esta clase de compuestos ya que el extracto de acetato de etilo mostró un mayor poder reductor a todas las concentraciones ensayadas, lo cual justifica la actividad antioxidante observada en este extracto. El uso de *E. laurifolia* como fuente natural antioxidante parece ser una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos para el tratamiento de diferentes enfermedades relacionadas al estrés oxidativo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ing. For. Juan Carmona por la identificación del material vegetal y al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes por el financiamiento de esta investigación según el Proyecto N° FA-486-10-08-B.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Jassbi AR. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry*. 2006; 67(18): 1977-1984.
- [2] Zargari A. Medicinal plants. 5^{ta} Ed. Tehran University Publication. Tehran. 1993; pp. 352-401.
- [3] Singla AK, Pathak K. Phytoconstituents of *Euphorbia* species. *Fitoterapia*. 1990; 41(6): 483-516.
- [4] Cateni F, Zilic J, Falsone G, Hollan F, Frausin F, Scarcia V. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003; 13(24): 4345-4350.
- [5] Natarajan D, Britto S, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G. Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*. A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*. 2005; 102(1): 123-126.
- [6] Farhan H, Rammal H, Hijazi A, Daher A, Reda M, Annan H, Chokr A, Bassal A, Badran B. Chemical composition and antioxidant activity of a Lebanese plant *Euphorbia macroclada* schyzoceras Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(7): 542-548.
- [7] Basma AA, Zakaria Z, Latha LY, Sasidharan S. Antioxidant activity and phytochemical screening of the methanol extracts of *Euphorbia hirta* L. *Asian Pac J Trop Med*. 2011; 4(5): 386-390.
- [8] Ma QG, Liu WZ, Wu XY, Zhou TX, Qin GW. Diterpenoids from *Euphorbia fisheriana*. *Phytochemistry*. 1997; 44(4): 663-666.
- [9] Ahmad VU, Hussain H, Bukhari IA, Hussain J, Jassbi AR, Dar A. Antinociceptive diterpene from *Euphorbia decipiens*. *Fitoterapia*. 2005; 76(2): 230-232.
- [10] Shi QW, Su XH, Kiyota H. Chemical and pharmacological research of the plant in genus *Euphorbia*. *Chem Rev*. 2008; 108(10): 4295-4327.
- [11] Madureira AM, Gyémánt N, Ascenso JR, Abreu PA, Molnár J, Ferreira MJ. Euphoportlansols A and B, tetracyclic diterpene polyesters from *Euphorbia portlandica* and their anti-MDR effects in cancer cells. *J Nat Prod*. 2006; 69(6): 950-953.
- [12] Reis M, Ferreira RJ, Santos MM, Dos Santos DJ, Molnár J, Ferreira MJ. Enhancing macrocyclic diterpenes as multidrugs-resistance reverses: structure-activity studies on Jolkinol D derivatives. *J Med Chem*. 2013; 56(3): 748-760.
- [13] Duarte N, Gyémánt N, Abreu PM, Molnár J, Ferreira MJ. New macrocyclic Lathyrane diterpens from *Euphorbia lagascae* as inhibitors of multidrug resistance of tumour cells. *Planta Med*. 2006; 72(2): 162-168.
- [14] Molnár J, Gyémánt N, Tanaka M, Hohmann J, Bergmann E, Molnár P, Deli J, *et al*. Inhibition of multidrugs resistance of cancer cells by natural diterpenes triterpenes and carotenoids. *Curr Pharm Des*. 2006; 12(3): 287-311.
- [15] Hokche O, Berry P, Huber O. Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. Caracas: Fundación Instituto Botánico de Venezuela; Caracas-Venezuela. 2008; pp. 370.
- [16] Ávila L, Pérez M, Sánchez-Dufhues G, Hernández-Galán R, Muñoz E, Cabezas F, Quiñones W, *et al*. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry*. 2010; 71(2): 243-248.
- [17] Rondón M, Morales A, Amaro-Luis JM, Bahsas A, Rojas J, Buitrago D. Latazienone, a new lathyrane-type diterpenoid from *Euphorbia latazi* Kunth. *Nat Prod Res*. 2005; 19(6): 597-602.
- [18] Diaz L, De-Montijo S, Medina A, Meléndez P, Laurence V, Marti, G. Activity of ethanolic extracts of *Machaerium floribundum* against acne-inducing

bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. Rev Peru Biol. 2011; 18(2): 153-158.

[19] Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot MJ. Antioxidant compounds of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts. J Sci Food Agr. 1999; 79(12): 1625-1634.

[20] Lamien-Meda A, Lamien ECh, Compaoré MM, Meda RN, Kiendrebeogo M, Zeba B, Millogo JF, *et al.* Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. Molecules. 2008; 13(3):581-594.

[21] Agrawal P, Bansal M. En Agrawal P.K. (ed) Carbon-13 NMR of Flavonoids. 2 Ed. New York. 1989; 103.

[22] Olennikov DN, Tankhaeva LM, Partikhaev VV, Rokhin AV. Chemical constituents of *Caragan bungei* shoots. Braz J Pharmacog. 2011; 22(3): 490-496.

[23] Abdel-Monem AR, Abdel-Sattar E, Harraz FM, Petereit F. Chemical investigation of *Euphorbia schimperii* C. Presl. Rec Nat Prod. 2008; 2(2): 39-45.

[24] Knight SA. The carbon-13 NMR spectra of lanosterol, euphadienol and euphenol. Tetrahedron

Lett. 1973; 14(1): 83-86.

[25] Maoulainine BM, Jelassi A, Hassen I, Boukhari A. Antioxidant proprieties of methanolic and ethanolic extracts of *Euphorbia helioscopia* (L) aerial parts. Int Food Res J. 2012; 19(3): 1125-1130.

[26] Barla A, Öztürk M, Kültür S, Öksüz S. Screening of antioxidant activity of three *Euphorbia* species from Turkey. Fitoterapia. 2007; 78(6): 423-425.

[27] Ashraf A, Adilsarfraz RA, Abid MA, Shahid M. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. J Food Drug Anal. 2015; 23(1):109-105.

[28] Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med J. 1996; 20(7): 933-956.

[29] Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J Agric Food Chem. 2001; 49(6): 2774-2779.

[30] Materska M, Perucka I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annum* L.). J Agr Food Chem. 2005; 53(5): 1750-1756.