

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *ROUPALA MONTANA* AUBL. DE LA PROVINCIA DE LOJA

Juan Carlos Medina ¹, Alírica Suárez ^{1,2}, Nixon Cumbicus³, Vladimir Morocho ^{1*}

¹ Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Química y Ciencias Exactas, Loja, Ecuador

² Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Caracas, Venezuela

³ Universidad Técnica Particular de Loja, Departamento de Ciencias Biológicas, Loja, Ecuador

*Autor para correspondencia: e-mail: svmorocho@utpl.edu.ec

Recibido: 2018/09/03

Aprobado: 2018/11/23

DOI: <https://doi.org/10.26621/XV19.2018.12.A01.PUCESI.2550.6684>

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aisló y caracterizó metabolitos secundarios a partir de las hojas de la especie *Roupala montana* Aubl., mediante técnicas espectroscópicas como Resonancia magnética nuclear (RMN) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Se identificaron tres compuestos conocidos como Kaur-16-ene, Ácido linolénico y alfa tocoferol del extracto de Hexano. Además, se obtuvo el aceite esencial de la planta seca, mediante destilación por arrastre de vapor, y se identificó sus compuestos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama (CG-FID). Se identificó un total de 15 compuestos, siendo los mayoritarios: kaur-16-ene (77,2%), el Kaur-15-ene (4,1 %), phytol (3,45%), el Nerolidol <(E)-> (2,22%), y Farnesyl acetone <(5E,9E)-> (1,2%).

Palabras clave: *Roupala montana* Aubl., Proteaceae, Kaur-16-ene, ácido linolénico, alfa tocoferol

ABSTRACT

In order to carry out this investigation, secondary metabolites were isolated and characterized from the leaves of the *Roupala montana* Aubl. species, by means of spectroscopic techniques, such as nuclear magnetic resonance (NMR) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Three compounds known as Kaur-16-ene, linolenic acid and alpha tocopherol were identified from the Hexane extract. In addition, essential oil of the dried plant was obtained by steam distillation, and its compounds were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography coupled to the flame ionization detector (CG-FID). A total of 15 compounds were identified, the majority being: kaur-16-ene (77.2%), Kaur-15-ene (4.1%), Phytol (3.45%), Nerolidol <(E)-> (2.22%), and Farnesyl acetone <(5E, 9E)-> (1.2%).

Keywords: *Roupala montana* Aubl., Proteaceae, Kaur-16-ene, linolenic acid, alfa tocopherol

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales constituyen un recurso primordial en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de las plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención de salud y que la mayor parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Bermudez et al. 2005).

La mayor diversidad de flora presente en el Ecuador ha sido estudiada y reconocida desde hace mucho tiempo atrás por ser altamente rica en plantas útiles ya sean medicinales, comestibles, por lo cual se ha reportado 5172 especies útiles de las que un 60% son plantas que han demostrado un efecto terapéutico (de la Torre, Navarrete, M., Macía, y Balslev, 2008; Jørgense, Neill, y León-Yanez, 1999).

La familia *Proteaceae* tiene una distribución en regiones subtropicales, principalmente en el hemisferio sur, se encuentra integrada por unos 75 géneros y más de 1000 especies distribuidos en las regiones subtropicales y tropicales. En América se conocen ocho géneros de los cuales hasta el momento existen pocos estudios de carácter fitoquímico y biológicos (Calderon, 2006).

El género *Roupala* es uno de los cinco géneros de *Proteaceae* endémicos de América, el cual crece en Centroamérica, llegando hasta Perú y Brasil. *Roupala* es el género más grande y taxonómicamente más complicado de los *Proteaceae* (Edwards, 2003).

Roupala montana Aubl. es un árbol de aproximadamente 6 a 20 m de alto, posee una corteza y hojas de un olor desagradable al momento de estrujarlas (olor a atún), esta es una especie muy poco común que se encuentra en bosques nublados, en todas las zonas del país; en una altitud de 1100-1500 m.s.n.m. (Calderón, 2006).

MATERIALES Y METODOLOGÍA

Información general

Los espectros de RMN se realizaron en un equipo Varian 400 MHz para ^1H , 100 MHz para ^{13}C , los compuestos se disolvieron en CDCl_3 . Los desplazamientos químicos se reportan en ppm, en relación con la señal de tetrametilsilano (TMS) y constantes de acoplamiento (J) en Hz. Los análisis CG-EM se realizaron en un Cromatógrafo de gases 6890N marca Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5973N. Para los análisis de CG-EM y CG-FID, el instrumento fue equipado con una columna DB5-MS Agilent 122-5532. La gel de sílice 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania, de 0.063 a 0.200 mm) y RP-18 (Merck, KGaA, Darmstadt, Alemania, 40–63 μm) se utilizaron como fases estacionarias para la columna de cromatografía de capa fina de fase normal (CCF), las placas de CCF se revelaron con una mezcla de ácido sulfúrico y vainillina. La rotación óptica se realizó en un polarímetro automático (Jinan Hanon Instruments Co. Ltd., Jinan, China) MRC P810. El índice de refracción se midió con un refractómetro digital ABBE (Boeco, Hamburgo, Alemania).

Recolección del material vegetal

Las hojas de *R. montana* en estado de floración se recolectaron en el sector Santa Teresa de la ciudad de Cariamanga, a una altitud de 1800 m. s.n.m con coordenadas $4^{\circ}17'11''\text{S}$, $79^{\circ}31'41''\text{W}$ en el mes de febrero del 2016. La muestra botánica fue identificada por Nixon Cumbicus curador y depositada en el Herbario de la Universidad Técnica Particular de Loja con código A.CH 001.

Extracción y aislamiento de metabolitos secundarios

A partir de 500g de hojas secas trituradas se obtuvo los extractos mediante maceración dinámica con solventes en una polaridad creciente hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en una relación 1:10 planta: disolvente, por un periodo de una hora, este proceso se realizó por triplicado con cada disolvente. Posteriormente se filtró a vacío y se concentró a presión reducida a una temperatura de 30 °C. Del extracto en hexano se procedió a realizar una cromatografía en columna en relación de 2:1 extracto: sílica, tomando 2g del extracto y 100g de sílica fase directa. Se eluyó en polaridad creciente iniciando con 100% Hex hasta AcOEt 100%. Una vez obtenidas las 10 fracciones se realizó Cromatografía en Capa Fina (CCF), para ello se utilizó placas de sílica gel 60 F254 (fase directa) para la fase estacionaria y para la fase móvil se utilizaron disolvente Hex:AcOEt en diferentes relaciones que fueron desde 9.5:0.5 y 5:5. El revelado de las placas CCF se utilizó ácido sulfúrico al 5% y vainillina al 12%. Se unió las fracciones tomando en cuenta su factor de retención (rf) y color de los compuestos. Se obtuvo un total de 10 fracciones (JM001-3 a JM010-3).

La fracción JM001-3 (23mg) fue purificada usando una microcolumna la cual eluyó con una polaridad isocrática 95:05 Hex-AcOEt obteniendo el compuesto Kaur-16-ene (1). La fracción JM010-3 (55mg) se realizó una columna cromatográfica en una polaridad isocrática 7:3 Hex-AcOEt obteniendo el compuesto ácido linolénico (2). De la fracción JM003-3 (194,3mg) a la que se le realizó una columna cromatográfica en una polaridad isocrática 7:3 Hex:Diclorometano, obteniendo el compuesto alfa-tocoferol (3).

Extracción del aceite esencial y determinación de la composición química

Para la extracción del aceite esencial de *R. montana* se humedecieron 3 kg de las hojas secas de la planta durante un tiempo de 15 minutos, para luego proceder a la destilación por arrastre de vapor de agua por 3 horas.

Luego de haber obtenido el aceite esencial se añadió sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), para eliminar agua del aceite esencial. Las muestras de análisis se prepararon en un vial de cromatografía debidamente codificado, en el cual se colocó 990 μL de diclorometano, y 10 μL del aceite esencial de *R. montana* obteniendo una concentración del 1% (v/v) del aceite esencial.

La identificación de los componentes químicos de *R. montana* se hizo mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas CG-EM y al detector de Ionización de llama CG-FID, con el fin de obtener resultados cualitativos y cuantitativos.

La corrida cromatográfica se realizó utilizando una mezcla de hidrocarburos de C9 (nonano) a C25 (pentacosano), estos se utilizarán para realizar el cálculo de los índices de retención, además se inyectó la muestra y los hidrocarburos bajo las mismas condiciones.

Para la determinación de los índices de retención se utilizó la muestra de la mezcla de n-alcanos (C9-C25), los resultados se interpretarán mediante la comparación de los valores de retención calculados con los valores reportados en bibliografía (Adams, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los compuestos

En esta investigación, del extracto en hexano de *R. montana* se identificaron 3 compuestos: un diterpeno conocido como Kaur-16-ene (1), ácido linolénico (2) y alfa-Tocoferol (3) (Figura 1). En la tabla 1 y 2 se indican los datos de RMN de los compuestos identificados.

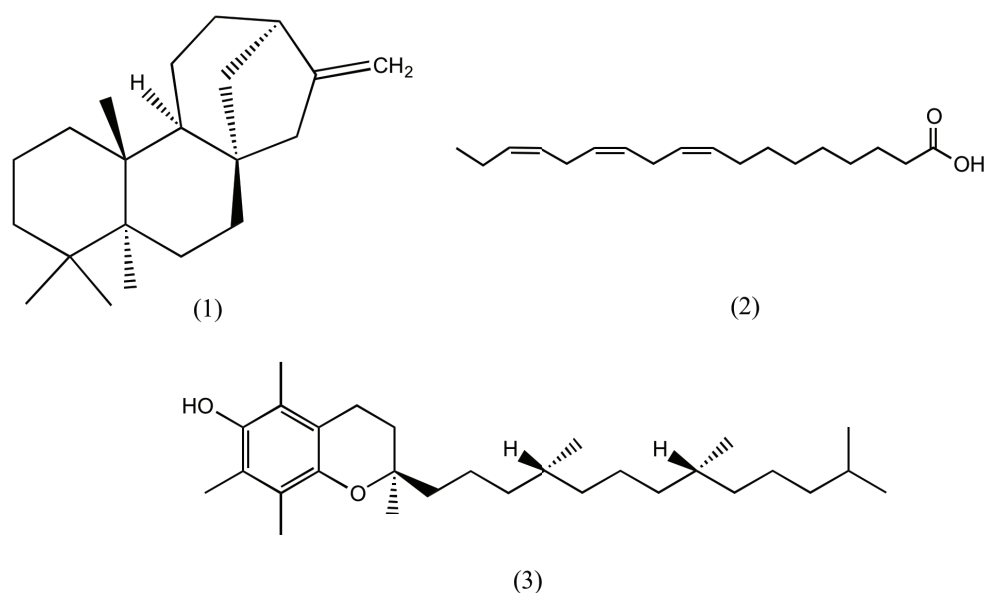


Figura 1. Estructuras químicas de los compuestos aislados de *R. montana*

Kaur-16-ene, es un diterpeno de fórmula molecular $C_{20}H_{32}$ y con un peso molecular de 272 g/mol. Los diterpenos son un foco de descubrimiento de fármacos de productos naturales debido a su gran diversidad estructural y actividad biológica que puedan presentar (Jian, Zhang, Liu, 2018).

La utilización de diterpenos Kaurénicos en conversiones microbiológicas están dirigidas a estudios de biosíntesis y diversas actividades biológicas, los compuestos Kaurénicos que establecen un enlace de hidrógeno con un grupo funcional carbonilo C-15 están asociados con actividad de tipo antitumoral y actividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas (Takahashi, Gomes, Lyra, Do Santos, y Martins, 2014).

Ácido linolénico, es un ácido graso de fórmula molecular $C_{18}H_{30}O_2$ y con un peso molecular de 278 g/mol. De acuerdo a estudios realizados en Costa Rica el ácido linolénico posee efectos protectores hacia enfermedades cardiovasculares, ya que el consumo de este ácido alfa-linolénico en la dieta de las personas en las cuales se realizó dicho estudio se pudo observar que estas presentan un menor riesgo de algún tipo de infarto al miocardio (Baylin, 2003).

En estudios complementarios se ha demostrado que el ácido linolénico posee actividad antibacteriana, antifúngica y algunos presentan propiedades antiinflamatorias (Jozwiak, m.; Stepien, k.; Nigro, E.; Wrzosek, M.; Olejarz, W.; Kubiak-Tomaszewska, G.; Filipowska, A.; Filipowski, W.; Struga, M. 2018).

Alfa-Tocoferol, que es un derivado de la vitamina E de fórmula molecular $C_{29}H_{50}O_2$ y con un peso molecular de 430 g/mol. La vitamina E representa el nombre de un grupo de compuestos de tocol entre los cuales están los tocoferoles y los tocotrienoles los cuales son biológicamente activos y naturales, el alfa-tocoferol es la forma que se conserva en el cuerpo humano, además de ser un antioxidante soluble en lípidos es un micronutriente esencial (Leng, X., Zhu, F., y Wassall, S. R. 2018). El alfa-tocoferol es el más activo como vitamina de los varios compuestos denominados tocoferoles y usado en terapéutica, además es relativamente inestable al contacto con el aire por lo cual en su mayoría de formas industriales son de tipo ésteres de acetato o succinato (Acofarma, 2019).

Tabla 1. Datos de ¹H RMN de los compuestos 1,2 y 3 (400 MHz, CDCl₃)

Kaur-16-ene	Ácido linolénico	Alfa tocoferol
2,63 (s, H-13)	0.97 (t, J=7.2 Hz)	2,12 (3H, s,6H, CH ₃)
4,73 (1H, s, H-17a)	1.25-1.32 (m, CH ₂)	2,17 (3H, s,3H, CH ₃)
4,78 (1H, s, H-17b)	1.60-1.65 (m, β-CH ₂)	2,62 (t, J=6,8 Hz, 2H-4)
1,02 (3H, s, H-19)	2.00-2.10 (m, CH=CH)	
0,85 (3H, s, H-18)	2.34 (t, J=7.2 Hz α-CH ₂)	
0,81 (3H, s, H-19)	2.75-2.82 (m, CH=CH)	
	5.33-5.39 (m, CH=CH)	

Tabla 2. Datos de ¹³C NMR de los compuestos 1 y 2 (100 MHz, CDCl₃)

	Kaur-16-ene	Alfa tocoferol
C1	41.4	11.4
C2	18.8	11.9
C3	42.2	12.3
C4	33.4	19.8
C5	56.2	19.9
C6	20.4	20.9
C7	40.5	21.1
C8	44.2	22.7
C9	56.4	22.8
C10	39.4	23.9
C11	18.3	24.6
C12	33.4	24.9
C13	44.3	28.1
C14	40.0	31.7
C15	49.3	32.8
C16	156.3	32.9
C17	102.9	37.4
C18	33.8	37.5
C19	21.8	37.6
C20	17.7	37.6
C21		39.5
C22		39.9
C23		74.6
C24		117.5
C25		118.6
C26		121.1
C27		122.7
C28		144.6
C29		145.6

Composición Química del aceite esencial de *Roupala montana*

Se identificaron 15 compuestos del aceite esencial de *R. montana* obteniendo un 92,50% del total del aceite esencial. Los componentes mayoritarios fueron el kaur-16-ene (77,2%), Kaur-15-ene (4,1 %), y phytol (3,45%). Ver tabla 3.

Tabla 3. Compuestos del aceite esencial de *R. montana*

N°	Nombre	IRC	IRL	Porcentaje
1	Caryophyllene <(Z)->	1403	1408	0,47
2	Neryl acetone	1446	1436	0,26
3	Aristolochene <4,5-di-epi->	1472	1471	0,28
4	Aristolochene	1480	1487	0,36
5	Cadinene < γ ->	1506	1513	0,21
6	Nerolidol <(E)->	1558	1561	2,22
7	Hexenyl benzoate <(3Z)->	1563	1565	0,98
8	Eudesmol < β ->	1638	1649	0,42
9	Bisabolone <(6R,7R)->	1733	1740	0,75
10	Farnesyl acetone <(5E,9E)->	1904	1913	1,20
11	Isophytol	1947	1946	0,41
12	Kaur-15-ene	1960	1997	4,10
13	Kaur-16-ene	2013	2042	77,20
14	Heneicosane <n->	2100	2100	0,14
15	Phytol	2108	2112	3,45
	Total			92,50

No se ha encontrado estudios realizados en el aceite esencial de *Roupala montana*, pero lo que se puede comprobar con el estudio del este aceite esencial es la presencia del Kaur-16-ene con un 77,2 % como compuesto mayoritario el mismo que se lo pudo identificar y caracterizar mediante métodos cromatográficos a partir del extracto de hexano de la especie *R. montana*.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se realizó la extracción de la parte no volátil de *R. montana* obteniendo 3 compuestos conocidos como Kaur-16-ene, ácido linolénico y alfa tocoferol y de la parte volátil a partir del aceite esencial de la planta seca se identificaron 15 compuestos, siendo los mayoritarios kaur-16-ene (77,2%), el Kaur-15-ene (4,1 %), el phytol (3,45%), el Nerolidol <(E)-> (2,22%), y el Farnesyl acetone <(5E,9E)-> (1,2%).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcofarma (2009). Vitamina E (Alfa-Tocoferol Acetato). Recuperado de <https://www.acofarma.com//idb/descarga/3/f2cd2531fd196166.pdf>.
- Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007; ISBN 10-1932633219.
- Baylin, A. (2003). Adipose Tissue alpha-Linolenic Acid and Nonfatal Acute Myocardial Infarction in Costa Rica. *Circulation*, 107(12), 1586–159
- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., y Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales Alexis Bermúdez, maría a. Oliveira-miranda. *Interciencia*, 30(8), 453–459.
- Calderón de Rzedowski, G. (2006). Proteaceae. *Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes*, 143, 7.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macia, M., y Balslev, H. (2008). Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador. (M. De la Torre, I., Navarrete, H., Muriel, P., Macia, Ed.). Quito.
- Edwards, K. S., y Prance, G. T. (2003). Four new species of *Roupala* (Proteaceae). *Brittonia*, 55(1), 61–68.
- Jian, B., Zhang, H., Liu, J. (2018) Structural Diversity and Biological Activities of Diterpenoids Derived from *Euphorbia fischeriana* Steud. *Molecules*, 23, 935.
- Jørgense, P., Neill, D., y León-Yanez, S. (1999). *Catalogue of Vascular Plants of Ecuador*. St. Louis: Missouri Botanical Garden.
- Jozwiak, m.; Stepien, k.; Nigro, E.; Wrzosek, M.; Olejarz, W.; Kubiak-Tomaszewska, G.; Filipowska, A.; Filipowski, W.; Struga, M. (2018) Synthesis, Structural Studies and Biological Evaluation of Connections of Thiosemicarbazide, 1,2,4-Triazole and 1,3,4-Thiadiazole with Palmitic Acid. *Molecules*, 23, 822.
- Leng, X., Zhu, F., y Wassall, S. R. (2018). Vitamin E Has Reduced Affinity for a Polyunsaturated Phospholipid: An Umbrella Sampling MD Simulations Study. *The Journal of Physical Chemistry B*.
- Takahashi, J.A.; Gomes, D.C.; Lyra, F.H.; dos Santos, G.F.; Martins, L.R. (2014). The Remarkable Structural Diversity Achieved in ent-Kaurane Diterpenes by Fungal Biotransformations. *Molecules*, 19, 1856-1886.