



Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de los Andes venezolanos

Gina Meccia^{1*}, Patricia Quintero¹, Luis B. Rojas¹, Alfredo Usubillaga¹, Juan Carmona²

1) Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bioanálisis,
Universidad de Los Andes, Urb. Campo de Oro, Mérida, Venezuela.

2) Herbario MERF. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes,
Urb. Campo de Oro, Mérida, Venezuela

(*) gmeccia@ula.ve

Recibido: 21/01/2010

Aceptado: 07/04/2010

Resumen

Espeletiopsis angustifolia fue recolectada en el páramo San José de Acequias (Estado Mérida) a 2870 m.s.n.m. Las hojas secas y molidas se extrajeron con una mezcla de hexano-éter dietílico (3:1). Este extracto se agitó con NaOH 0,5 N para separar la fracción ácida, la cual fue purificada mediante cromatografía flash. Una alícuota de la misma se metiló con diazometano y analizó por CG-EM, lo que permitió identificar (bajo la forma de ésteres metílicos) ácido *ent*-kaurénico (18,6%), ácido *ent*-15 α -*O*-isovaleroxi-kaur-16-en-19-oico (16,2%), ácido *ent*-15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico (ácido grandiflorólico, 9,2%), ácido *ent*-kauránico (4,9%), ácido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico (ácido grandiflorénico, 4,5%) y ácido *ent*-15 α -*O*-acetoxi-kaur-16-en-19-oico (3,4%). En la fracción neutra se encontró *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol, 32,7%) y varias ceras formadas por *n*-alcanos de cadena larga, predominando las de número impar de carbonos: heptacosano (38,3%), nonacosano (21,0%) y entriacontano (4,6%).

Palabras clave: *Espeletiopsis angustifolia*; ácidos kaurénicos; Espeletiinae; frailejón; Cromatografía de Gases-Espectroscopía de Masas

Abstract

Analysis of kaurenic acids present in *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. from the Venezuelan Andes. Leaves of *Espeletiopsis angustifolia* were collected at paramo of San José de Acequias (Mérida State) at 2870 m.a.s.l. The dried leaves were minced and extracted with hexane-diethyl ether (3:1). This extract was shaken with 0.5 N NaOH to separate the acid fraction which was purified by flash chromatography. An aliquote of it was methylated with diazomethane and analyzed by GC-MS which permitted to identify *ent*-kaurenic acid (18.6%), *ent*-15 α -*O*-isovaleroxy-kaur-16-en-19-oic acid (16.2%), *ent*-15 α -hidroxy-kaur-16-en-19-oic acid (grandiflorolic acid, 9.2%), *ent*-kauranic acid (4.9%), *ent*-kaur-9(11),16-diene-19-oic acid (grandiflorencic acid, 4.5%) and *ent*-15 α -*O*-acetoxi-kaur-16-en-19-oic acid (3.4%). The neutral fraction yielded *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol, 32.7%) and several long-chain wax *n*-alkanes with predominance of odd carbon number alkanes: heptacosane (38.3%), nonacosane (21.0%) and entriacontane (4.6%).

Keywords: *Espeletiopsis angustifolia*; kaurenic acids; Espeletiinae; frailejon; Gas Chromatograph-Mass Spectrometry

Introducción

Los frailejones, representantes típicos de los páramos andinos, son plantas resinosas pertenecientes a la subtribu Espeletiinae (Asteraceae), que presentan un crecimiento característico en forma de roseta¹ y se encuentran distribuidos en las zonas altas de Colombia, Venezuela y el norte de Ecuador². Las especies de esta subtribu producen principalmente diterpenos del tipo kaurenol³⁻⁶, los cuales

tienen interés desde el punto de vista químico, botánico y medicinal, ya que han manifestado actividad citotóxica en diferentes líneas de células de carcinoma⁷, efectos esteroi-dogénicos⁸ y efectos pro-apoptóticos en humanos contra líneas celulares PC-3^{9,10}. En menor proporción producen triterpenos¹¹, sesquiterpenos^{4,12} y aceites esenciales¹³⁻¹⁵.

La subtribu Espeletiinae fue creada en 1976 por Cuatrecasas¹⁶ y está conformada por ocho géneros y

aproximadamente 180 especies que anteriormente estaban ubicadas en el género *Espeletia*. El género *Espeletopsis* está integrado por 20 especies, distribuidas en Colombia y Venezuela¹, siendo *Espeletopsis angustifolia* Cuatrec. una de las seis especies reportadas para nuestro país².

En las últimas tres décadas, nuestro grupo de investigación ha mostrado interés por el estudio de las principales especies de frailejón que crecen en los páramos del Estado Mérida, con la finalidad de aportar nuevos conocimientos sobre su fitoquímica y su posible actividad biológica.

En relación a la especie en estudio, hasta el momento solo se ha reportado la composición química y la actividad antibacteriana de sus aceites esenciales contra las cepas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*¹⁷.

En el presente trabajo se muestran los primeros resultados en relación al análisis fitoquímico de las hojas de *E. angustifolia* Cuatrec.

Parte experimental

Material vegetal

Espeletopsis angustifolia Cuatrec. se recolectó en el Páramo San José de Acequias, Estado Mérida, en Junio de 2008, a 2870 m.s.n.m. (8° 21.002 N, 71° 18.443 W). La planta fue identificada por el Ing. Forestal Juan Carmona. Una muestra testigo (LBR 040) se depositó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

Obtención del extracto de hexano-éter

Las hojas de *E. angustifolia* se secaron en la estufa a 40 °C durante una semana. A partir del material seco y molido (740 g) se realizó una extracción con *n*-hexano-éter etílico (3:1) a temperatura ambiente por 4 días. El extracto crudo se concentró hasta sequedad, obteniéndose un residuo sólido de 41 g.

Aislamiento de los ácidos kaurénicos

El extracto crudo se disolvió en *n*-hexano-éter etílico (3:1) y se agitó con una solución al 5% de NaOH. La fase acuosa resultante se acidificó con HCl concentrado hasta pH 3 y se agitó con *n*-hexano-éter etílico (3:1), obteniéndose 720 mg de fracción ácida. Por otra parte, la fracción neutra obtenida se decoloró mediante ebullición con carbón activado en hexano y posteriormente se purificó a través de una columna de silicagel, obteniéndose 1,53 g de material sólido.

Análisis por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas (CG-EM)

Una pequeña porción (10 mg) de la fracción ácida fue sometida a metilación con diazometano generado *in situ* en solución etérea^{18,19} y posteriormente se analizó por CG-

EM, usando una columna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm d.i, 0,25 μm de espesor de película). Como gas portador se utilizó helio a razón de 0,9 mL/min. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: temperatura inicial = 250 °C, con un incremento de 5°/min hasta 300 °C.

Los ésteres metílicos de los derivados del kaureno presentes en la fracción ácida se identificaron por comparación de los tiempos de retención y los espectros de masas de cada uno de los componentes con patrones existentes en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Resultados y discusión

El análisis por CG-EM de la fracción ácida metilada con diazometano, permitió la identificación de varios ácidos kaurénicos presentes en la resina de *E. angustifolia*. Los tiempos de retención y la abundancia relativa de los ésteres metílicos de los ácidos kaurénicos identificados se pueden observar en la tabla 1, y sus respectivas estructuras se muestran en la figura 1.

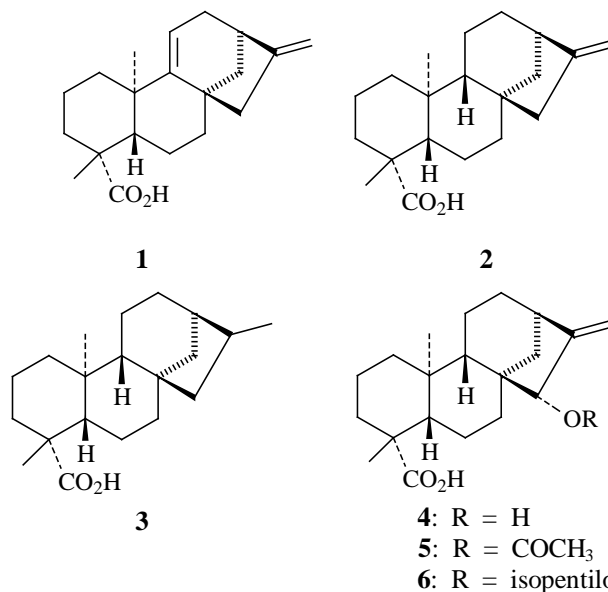


Figura 1: Estructuras de los ácidos kaurénicos identificados en la fracción ácida de la resina de *Espeletopsis angustifolia* Cuatrec.

Los diterpenos de tipo kaureno: ácido *ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oico (ácido grandiflorénico, **1**), ácido *ent*-kaur-16-en-19-oico (ácido kaurénico, **2**), ácido *ent*-kaur-19-oico (ácido kauránico, **3**), ácido *ent*-15α-hidroxi-kaur-16-en-19-oico (ácido grandiflorólico, **4**), ácido *ent*-15α-*O*-acetoxi-kaur-16-en-19-oico, **5** y ácido *ent*-15α-*O*-isovaleroxi-kaur-16-en-19-oico, **6**, representan los principales componentes de la fracción ácida (56,8% del total de la misma, figura 1) y todos ellos han sido

reportados en varias especies de los géneros *Espeletia*, *Coespeletia*, *Libanothamus* y *Ruilopezia* de la subtribu Espeletiinae, lo que indica la estrecha relación existente entre los diferentes tipos de frailejones.

Los ácidos más abundantes encontrados en las hojas de *E. angustifolia* resultaron ser: el ácido kaurénico **2** (18,6%) y el ácido *ent*-15 α -*O*-isovaleroxi-kaur-16-en-19-oico **4** (16,2%). El restante 43% de dicha fracción corresponde a otras sustancias ácidas minoritarias, posiblemente derivados del kaureno que no se han podido identificar.

A partir de la fracción neutra del extracto de las hojas se logró identificar por CG-EM *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol, **7**, figura 2) con una abundancia de 32,7%, mientras que el 67,2% corresponde a ceras (serie de *n*-alcanos de C₂₆ a C₃₁), observándose el predominio de las cadenas con número impar de átomos de carbono: heptacosano (38,3%), nonacosano (20,9%) y entriacontano (4,6%), como se muestra en la tabla 2.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos que señalan que la mayoría de las plantas superiores

terrestres producen en sus hojas abundantes *n*-alcanos de cadena larga (C₂₇ a C₃₅), los cuales son biosintetizados con una significativa preferencia de las cadenas con número impar de átomos de carbono sobre las de número par, siendo las más abundantes las de C₂₇, C₂₉ y C₃₁, y con un valor de CPI (índice de preferencia de carbono) mayor de 5²⁰, lo que conlleva consideraciones fitoquímicas o fisiológicas importantes para la planta²¹.

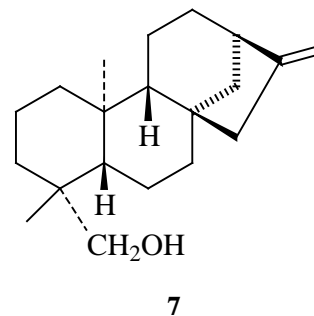


Figura 2 Estructura del kaurenol, identificado en la fracción neutra de la resina de *Espeletia angustifolia* Cuatrec.

Tabla 1: Ácidos kaurénicos presentes en la resina de *Espeletia angustifolia* Cuatrec. (fracción ácida) analizados como ésteres metílicos.

Nº	Componentes	TR (min)	Área %
1	<i>ent</i> -(-)-kaur-9(11),16-dien-19-metil éster	3,29	4,5
2	<i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-19-metil éster	3,76	18,6
3	No identificado (m/z 355, 330, 315, 281, 255, 207)	4,48	2,9
4	No identificado (m/z 330, 281, 276, 253, 207)	4,77	1,8
5	No identificado (m/z 332, 314, 281, 253, 207)	4,86	1,9
6	<i>ent</i> -(-)-kauran-19-metil éster	5,01	4,9
7	<i>ent</i> -15 α -hidroxi-(-)-kaur-16-en-19-metil éster	5,18	9,2
8	No identificado (m/z 328, 281, 253, 207)	5,31	2,2
9	No identificado (m/z 325, 281, 253, 207)	5,37	2,5
10	No identificado (m/z 332, 314, 281, 255, 207)	5,46	4,9
11	No identificado (m/z 378, 355, 281, 253, 207)	5,85	3,7
12	No identificado (m/z 378, 360, 345, 303, 281, 253, 207)	5,99	3,8
13	No identificado (m/z 372, 330, 303, 281, 253, 207)	6,04	4,6
14	No identificado (m/z 376, 355, 331, 281, 253, 207)	6,25	3,2
15	<i>ent</i> -15 α - <i>O</i> -acetoxi-(-)-kaur-16-en-19-metil éster	6,50	3,4
16	No identificado (m/z 374, 355, 314, 281, 255, 207)	6,75	5,8
17	<i>ent</i> -15 α - <i>O</i> -isovaleroxi-(-)-kaur-16-en-19-metil éster	7,65	16,2
Total:			94,1

Los *n*-alcanos son altamente resistentes a la degradación bioquímica, por lo que pueden estar asociados al detritus de las plantas y formar parte de los sedimentos de los

lagos. Además, los *n*-alcanos de C₂₉ y C₃₁ son considerados tradicionalmente como biomarcadores para las plantas superiores²².

Tabla 2: Componentes identificados en la fracción neutra obtenida de la resina de *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec.

Nº	Componentes	TR (min)	Área %
1	<i>ent</i> -(-)-kaur-16-en-19-ol (kaurenol)	3,75	32,7
2	hexacosano (C ₂₆ H ₅₄)	5,16	2,1
3	heptacosano (C ₂₇ H ₅₆)	5,95	38,3
4	octacosano (C ₂₈ H ₅₈)	6,71	1,3
5	nonacosano (C ₂₉ H ₆₀)	7,71	20,9
6	triacontano (C ₃₀ H ₆₂)	8,68	<i>t</i>
7	entriacontano (C ₃₁ H ₆₄)	9,69	4,6
Total:			99,9

Conclusiones

Esta investigación constituye el primer estudio fitoquímico realizado a *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec., y en él se demostró que al igual que otras muchas especies pertenecientes a la subtribu Espeletiinae (familia Asteraceae), sus hojas producen principalmente diterpenos de tipo kaurenol.

El análisis de la fracción ácida permitió la identificación de 6 ácidos de la serie *ent*-kaur-19-oico (correspondiente al 56,8 % del total); adicionalmente, en la fracción neutra se encontró una cantidad importante del alcohol *ent*-kaur-16-en-19-ol (kaurenol, en un 32,7 %). El análisis de los ésteres metílicos por CG-EM mostró que los ácidos *ent*-kaurénico (18,6%) y *ent*-15 α -*O*-isovaleroxi-kaur-16-en-19-oico (16,2%) son los ácidos más abundantes en esta especie, mientras que el ácido 15 α -hidroxi-kaur-16-en-19-oico resultó ser el tercero en abundancia, con 9,2%. Este último compuesto es de gran interés, ya que puede ser utilizado para obtener ácido 15-oxo-kaurénico, sustancia que produce apoptosis de las células epiteliales del cáncer de próstata⁹ y que generalmente es muy escaso en la mayoría de las especies de frailejón examinadas fitoquímicamente en nuestro laboratorio.

Por otra parte, se detectaron en pequeñas cantidades otros 11 compuestos que no fue posible identificar debido a que no se disponía de patrones de comparación. Cualquier tentativa de identificación solamente en base al espectro de masas no sería sustentable. Es necesario aislar cada compuesto y analizarlo mediante resonancia magnética nuclear para elucidar su estructura, una labor que no es posible realizar con las pequeñas cantidades disponibles en el presente estudio.

Agradecimiento

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes, por el soporte financiero para esta investigación (C.D.C.H.T. - Proyecto: FA-394-06-08-B).

Referencias

1. J Cuatrecasas. Clave provisional de las especies del género *Espeletiopsis* Cuatrec. (Espeletiinae, Compositae). **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, **54**, 370-377 (1996).
2. VM Badillo. Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. **Ernstia**, **11**, 147-215 (2001).
3. F Bohlmann, H Suding, J Cuatrecasas, RM King, H Robinson. New diterpenes from the subtribu Espeletiinae. **Phytochemistry**, **19**, 267-271 (1980a).
4. F Bohlmann, H Suding, J Cuatrecasas, RM King, H Robinson. Tricyclic sesquiterpenes and futher diterpenes from *Espeletiopsis* species. **Phytochemistry**, **19**, 2399-2403 (1980b).
5. F Seaman, F Bohlmann, C Zdero, TJ Mabry. Diterpenes of Flowering Plants. Compositae (Asteraceae). Springer-Verlag, New York (1990).
6. A Usubillaga, M Romero, R. Aparicio R. Kaurenic acid in Espeletiinae. **Acta Horticulturae**, 129-130 (2003).
7. A Diaz, E Dorta, M Cueto, J Roviroso, A San-Martín, A Loyola, A Darias. Labdane diterpenes with a new oxidation pattern from the marine pulmonate *Trimusculus peruvianus*. **Tetrahedron**, **59**, 4805-4809 (2003).
8. K Moriwaki, M Gomi, Y Itoh, S Lida, M Tsugawa, S Tanui, K Fuji, M Dode, T Kajimoto. Steroidogenic effect on *ent*-kaur-16-en-15 β -ol (kaurenol) on isolated rat adrenal cells. **Life Science**, **38**, 453-458 (1986).
9. Y Ruiz, J Rodrigues, F Arvelo, A Usubillaga, M Monsalve, N Diez, I Galindo. Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent*-15-oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. **Phytochemistry**, **69**, 432-438 (2008).
10. F Nagashima, M Kondoh, M Kawase, S Simizu, H Osada, M Watanabe, M Sato, Y Asakawa Apoptosis-inducing properties of *ent*-kaurenol-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncate*. **Planta Médica**, **69**, 377-379 (2003).

11. AN Tellez, R Torrenegra, J Pedroso, A Martinez. Cyclo eucalen-3 β -(2-methyl butanoate). New cycloeucalen isolate from the *Espeletia barclayana* Cuatrec. (Asteraceae). **Molecules**, **5**, M-163 (2000).
12. F Bohlmann, C Zdero, J Cuatrecasas, RM King, H Robinson. Neue sesquiterpene und norditerpene aus vertretern der gattung *Libanothamnus*. **Phytochemistry**, **19**, 1145-1148 (1980c).
13. N Khouri, A Usubillaga, LB Rojas, F Galarraga. Essential oil of *Espeletia weddellii*. **Flavour and Fragrance Journal**, **15**, 263-265 (2000).
14. A Usubillaga, R Aparicio, M Romero, LB Rojas, N Khouri. Study of the essential oils from the leaves of four species of *Libanothamnus* from the Venezuelan Andes. **Flavour and Fragrance Journal**, **16**, 209-211 (2001).
15. R Aparicio, M Romero, N Khouri, LB Rojas, A Usubillaga. Volatile constituents from the leaves of three *Coespeletia* species from the Venezuelan Andes. **Journal of Essential Oil Research**, **14**, 37-39 (2002).
16. J Cuatrecasas. A new sub-tribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae. **Phytologia**, **35**, 43-61 (1976).
17. G Meccia, LB Rojas, J Velasco, T Díaz, A Usubillaga. Composition and Antibacterial Screening of the Essential Oils of Leaves and Roots of *Espeletia angustifolia* Cuatrec. **Natural Product Communications**, **2**(12): 1221-1224 (2007).
18. W Haitman, L Roll. Organic syntheses. Collective Vol II. John Wiley. & Sons, New York. pp. 461-464 (1957).
19. F Arndt. Organic syntheses. Collective Vol II. John Wiley. & Sons, New York. p. 165 (1957).
20. R Zhiguo, J Guodong, Z Zhaoyu, W Yi, J Ziawu. Comparison of carbon isotope composition of total organic carbon and long-chain *n*-alkanes from surface soils in eastern China and their significance. **Chinese Science Bulletin**, **53**, 3921-3927 (2008).
21. J Bruneton. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2da. Ed. Acribia S, A., Zaragoza (España). p. 167 (2001).
22. A Boom, R Marchant, H Hooghiemstra, J Sinninghe. CO₂- and temperature-controlled altitudinal shifts of C₄- and C₃-dominated grasslands allow reconstruction of palaeoatmospheric *p*CO₂. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, **177**, 151-168 (2002).