

Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae)

Carlos Andrés Coy Barrera^{1*}, Jorge Parra^{1**}, Luis Enrique Cuca Suárez^{2***}

¹ Universidad Militar Nueva Granada, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Departamento de Química. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Investigación en Productos Naturales Vegetales, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Bogotá, Colombia.

FECHA DE ENTREGA: 9 DE MARZO DE 2014
FECHA DE EVALUACIÓN: 14 DE MAYO DE 2014
FECHA DE APROBACIÓN: 2 DE JUNIO DE 2014

Resumen Con el objetivo de determinar la composición química del aceite esencial de hojas de la especie *R. heptaphylla* que pertenece a la familia Rutaceae y de la presencia preliminar de algunos metabolitos secundarios presentes en esta especie, se realizó la Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) al aceite esencial obtenido por arrastre con vapor y se realizaron pruebas químicas cualitativas de coloración y precipitación al extracto etanólico de hojas; encontrando para el caso del aceite la presencia principalmente de compuestos tipo monoterpeno y en el análisis fitoquímico preliminar la posible presencia de; flavonoides, alcaloides, terpenoides, compuestos aromáticos y taninos.

Abstract In order to determine the chemical composition of the essential oil of leaves belonging to the *R. heptaphylla* species (Rutaceae family) and to search for the preliminary presence of some secondary metabolites existing in this species, we carried out gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) to the essential oil resulting from steam distillation. Also, we performed qualitative coloring and precipitation chemical tests to the ethanol leaves extract. Regarding the oil, we found the presence of monoterpenoid compounds and when performing the preliminary phytochemical analysis, the possible presence of flavonoids, alkaloids, terpenoids, aromatic compounds, and tannin.

Palabras Clave: *Raputia*, Rutaceae, sesquiterpenos, alcaloide, limonoides, flavonoides

Keywords: *Raputia*, Rutaceae, sesquiterpenoids, alkaloid, limonoids, flavonoids.

* carlos.coy@unimilitar.edu.co

** jorgee.parraa@unimilitar.edu.co

*** lecucas@unal.edu.co

1. Introducción

De acuerdo con la tendencia de la población de hacer uso de medicamentos de origen natural, para los investigadores en productos naturales, se hace indispensable la profundización en el conocimiento de las plantas medicinales, analizar su composición química y los factores que puedan hacerla variar, conocer la estructura y las propiedades de los principios activos con miras para poder determinar su posible actividad farmacológica, determinar las indicaciones, contraindicaciones, efectos secundarios entre otros, con el fin de utilizarlas en el tratamiento y prevención de los problemas de salud.

La farmacognosia es la ciencia farmacéutica que se ocupa del estudio de las drogas y las sustancias medicamentosas de origen natural; la fitoquímica por su parte estudia las moléculas implicadas en la actividad de las plantas, el conocimiento de su estructura y de su comportamiento, este conocimiento es fundamental en un estudio farmacognóstico.[1,2]

Actualmente se tienen desarrollados una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos de una planta, consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular del compuesto como la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular o la formación de un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, lo que se conoce como una prueba fitoquímica preliminar.[3,4]

La familia Rutaceae, se caracteriza por poseer un sinnúmero de especies con un alto porcentaje de usos etnobotánicos, los cuales se encuentran ampliamente reportados en diversas bases de datos y revistas dedicadas al estudio de los productos naturales, este género en mención producen metabolitos secundarios con una variedad estructural interesante, destacando la producción de alcaloides, flavonoides limonoides y terpenos. [5,6,7,8,9,10,11,12] Esta información resulta interesante ya que sirve como prueba para continuar con estudios de carácter fitoquímico con el fin de encontrar potenciales sustancias con propiedades farmacológicas importantes en el campo de la medicina natural.

Además las investigaciones actuales han enfocado sus estudios en la búsqueda de compuestos que posean usos como agentes terapéuticos con el fin de controlar las diferentes enfermedades que derivan de los microorganismos, [13,14] además el uso de los aceites esenciales ha tomado un papel importante en esta búsqueda, debido a que muchas veces la mezcla de componentes terpénicos, (oxigenados varios de ellos), obtenidos por su correspondiente caracterización química por la técnica de CG-EM presentan algún tipo de actividad frente a bacterias comunes, [15,16] lo cual puede derivar en usos importantes y amplias perspectivas para el uso de los productos naturales tanto volátiles como fijos, aumentando las posibilidades y agentes terapéuticos derivados de plantas.

2. Parte experimental

2.1. Material vegetal

La muestra de *Raputia heptaphylla* hojas, corteza y madera fue recolectada en Albán, municipio de Cundinamarca, en el bosque llamado “formador de agua”, la muestra fue identificada y clasificada, un ejemplar de esta especie reposa en el Herbario Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia bajo el COL. 511102.

2.2. Obtención del aceite esencial de hojas de la especie *R. heptaphylla*

La muestra de hojas frescas fué trasladada al laboratorio de Investigación en la Universidad Militar Nueva Granada bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C, posteriormente se hizo la extracción del aceite esencial a 1 kg de material proveniente de cada especie, procedimiento que se realizó en un equipo de destilación por arrastre con vapor durante dos horas, el aceite esencial obtenido se separó de la capa acuosa, se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Una alícuota se envió para determinar su composición química. Se determinaron los índices de Kovats analizando conjuntamente la muestra con una mezcla de *n*-alcanos (C₈ a C₂₂). Los espectros de masas se realizaron en un equipo Hewlett Packard 5973 GC/MS a 70 eV, equipado con un inyector automático, utilizando una columna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25 mm). El programa de temperatura utilizado fue el mismo que se indicó para el análisis cromatográfico. Se inyectó una muestra de 1,0 mL de una solución al 2% del aceite esencial en *n*-hexano con reparto de 100:1. Se utilizó una temperatura de inyección de 200 °C. La identificación de los componentes de los aceites se realizó mediante comparación computarizada de los espectros obtenidos con los espectros de una Librería Wiley (6ta Edición).

3. Análisis fitoquímico preliminar

3.1. Reconocimiento de alcaloides

Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos y se encuentran en las plantas superiores de un ácido orgánico. En el análisis fitoquímico preliminar las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (de mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff), estas reacciones se basan en los siguientes comportamientos:

El yoduro de potásico cuando reacciona con cloruro mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico: $[\text{HgCl}_2 + 2\text{I}^- \rightarrow 2\text{Cl}^- + \text{HgI}_2]$ soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro:

$[\text{HgI}_2 + \text{I}^- \longrightarrow \text{HgI}_4^{2-}]$. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxyoduro mercuri amoníaco, que es soluble en exceso de complejo $[\text{HgI}_4^{2-}]$, generando intenso color amarillo.

Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante estos reactivos (Reactivo de mayer); muchos alcaloides presentes en un material vegetal forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles de fórmula general $\text{Bi}_3\text{B} \cdot \text{HI}$ (Reactivo de Draggendorf).

3.2. Reconocimiento de Flavonoides y Taninos

Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos libres, los Flavonoides son compuesto polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas verdes. Estos compuestos al igual que los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico.

Esta respuesta se debe al ataque producido por el Ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo).

3.3. Terpenos y esteroides

Elaborados a partir de los mismos precursores, terpenoides y esteroides constituyen sin duda, el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. Estos compuestos tienen en común que se pueden considerar formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del isopreno, están clasificados como lípidos insaponificables. La presencia de estos compuestos se pueden determinar por cromatografía de capa delgada; como estos metabolitos no producen por si solos manchas coloreadas en el cromatograma, su ubicación se detecta asperjando un agente revelador como el reactivo de vainillina ácido ortofosfórico (1 % vainillina y 10 % de ácido en etanol), originando un nuevo compuesto químico coloreado sensible a nuestro sistema ocular.

3.4. Reactivos utilizados para el análisis fitoquímico preliminar

La muestra fresca de la hojas *R. heptaphylla* fue macerada con etanol al 96 %, se separó el sobrenadante y se repartió en un frasco colector y en tres tubos de ensayo. A cada uno de los tubos se agregaron gotas de reactivo Mayer, Draggendorff, vainillina, FeCl_3 y Pancaldi respectivamente.

Alcaloides

Mayer. El reactivo Mayer se emplea para la caracterización no específica de alcaloides L a mayoría de los alcaloides reaccionan dando un precipitado blanco o amarillo claro, amorfo o cristalino. El precipitado es (una sal compleja) puede disolverse posteriormente en un solvente menos polar para su identificación. El reactivo Mayer se basa en la acidez de los alcaloides en su forma de sales (Clorhidratos) debido a que en medios básicos el reactivo Mayer no precipita. A 1 mL de extracto ácido agregar unas gotas de reactivo de Mayer. Observar formación de precipitado blanco.

Dragendorff. El reactivo de Dragendorff se prepara mezclando 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado en 20 ml de ácido nítrico al 30 % con una solución de 27.2 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua. Se deja en reposo por 24 horas, se decanta y se afora a 100 ml. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando se le adiciona esta reactivo a una solución ácida de alcaloides.

Taninos

Cloruro férrico ($FeCl_3$). Cloruro de hierro (III) como catalizador de reacciones de alquilación de benceno. La “prueba del cloruro férrico” es una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado de $FeO(OH)$. La sustancia orgánica se disuelve en agua, metanol o etanol, luego se añade la disolución neutra de cloruro: se forma un complejo coloreado transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol. Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, determina tanto fenoles como taninos. A 0.2 mL de extracto etanólico agregar 1 gota de solución de cloruro férrico al 0.1 %.

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalol, derivados del ácido gálico.

Terpenos y Esteroides

Vainillina. Solución al 1 % p/v de vainillina en metanol. El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. El ensayo de la vainillina es específico para flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianinas, las cuales tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B. La catequina es un flavan-3-ol monomérico frecuentemente usado como un estándar en el ensayo de la vainillina. El metanol, disolvente usado para el ensayo de la vainillina, puede afectar la cinética de reacción de la catequina y taninos con vainillina diferencialmente. El ensayo de la vainillina en metanol es más sensible

para los taninos poliméricos que para los flavan-3-oles monoméricos. Este ensayo es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, debe ser considerada la posibilidad de interferencias con dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 g con precisión y exactitud mayores a 1 g cuando la concentración óptima de reactantes y disolventes son elegidos.

Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrófilo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza. La estabilidad del color del aducto vainillina- tanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada y entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles.

Compuestos Aromáticos

Pancaldi. $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_4$, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, H_2SO_4 , H_2O , dando coloración azulada sobre la placa de sílice, es prueba positiva para compuestos aromáticos, puede ser que se de una reacción de oxidación sobre compuestos aromáticos de acuerdo con la estructura química del reactivo de Pancaldi. Con la muestra del frasco colector se realizó cromatografía en capa delgada; usando dos placas de sílica gel como fase estacionaria que se sembraron con tres muestras del extracto (1,2 y 3 gotas) usando como eluyente 15 gotas de etanol.

4. Resultados y discusión de resultados

En el cuadro 1 se muestran los resultados de la composición química del aceite esencial de hojas de la especie *R. heptaphylla*.

El análisis fitoquímico preliminar cualitativo mostró los siguientes resultados de acuerdo a cada uno de los reactivos utilizados en este ensayo, además se realizaron por duplicado buscando tener datos más confiables en cuanto a la información del tipo de componentes que posee la muestra vegetal.

Para el extracto etanólico de hojas de la especie *R. heptaphylla*, se puede evidenciar la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos y esteroides y compuesto aromáticos, lo que está de acuerdo con la literatura encontrada, sin embargo en Colombia es la primera vez que se realiza este ensayo preliminar para una especie con una variedad de metabolitos interesante sobretodo alcaloides y compuestos terpénicos del tipo limonoide. [12]

5. Conclusiones

En el perfil cromatográfico del aceite esencial se pueden observar 74 picos de los cuales, el 56 % son de tipo monoterpeno y el 43,2 % tipo sesquiterpeno. De estos

Índice de retención (Kovats)					
Compuesto	Tiempo	Calculado	Literatura	% áreas	Bibliografía
	de reten-			Muestras	
	ción				
Monoterpenos					
α -pineno	12095	930	934	13,1	[18]
canfeno	12585	949	953	10,96	[18]
β -Pineno	13715	977	980	9,49	[18]
β -Mirceno	14444	988	991	3,5	[18]
α -Felandreno	14846	998	1005	1,99	[18]
eucaliptol	15855	1028	1033	15,19	[18]
limoneno	15942	1030	1031	3,29	[18]
γ -terpineno	17049	1050	1059	2,01	[18]
α -terpinoleno	18198	1080	1089	1,01	[18]
alcanfor	19818	1140	1143	16,76	[18]
borneol	20832	1169	1165	2,39	[18]
acetato de bornilo	25227	1280	1285	3,72	[18]
Sesquiterpenos					
β -cariofileno	29983	1412	1418	2,16	[18]
α -cariofileno	30991	1441	1444	1,1	[18]
selina-3,7(11)- dieno	32699	1530	1542	2,04	[18]

Cuadro 1. Composición química del aceite esencial de hojas de *R. heptaphylla*.

Metabolito secundario	Prueba química	Resultado (*)	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
Alcaloides	Dragendorff	+++	Precipitado naranja
Flavonoides y taninos	FeCl ₃	+++	Coloración verde
Terpenos y esteroides	Vainillina	+++	Coloración rosada, morada
Compuestos aromáticos	Pancaldi	+++	Coloración azul

Cuadro 2. Resultados del análisis fitoquímico preliminar. (*) Los resultados se reportan: Poco (+), regular (++) , Abundante (+++), Negativo (-).

74 componentes fueron determinados 15, que representan el 88,06% del total de porcentaje de área del aceite esencial para monoterpenos y el 7,57% para 14 picos correspondientes a compuestos tipo sesquiterpeno.

El aceite esencial esta constituido principalmente por monoterpenos, (los mayoritarios se muestran en el cuadro 1) de los cuales los componentes mayo-

ritarios encontrados fueron canfeno (10,96%), eucaliptol (15,19%) y alcanfor (16,76%) siendo el alcanfor el compuesto con el mayor porcentaje. En cuanto a los sesquiterpenos, el constituyente que se encuentra en mayor porcentaje es el β -Cariofileno (2,16%).

El aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Raputia heptaphylla* esta constituido principalmente por compuestos monoterpénicos encontrándose en mayor proporción los siguientes componentes: Alcanfor, Eucaliptol y Canfeno, y sesquiterpenos en menor porcentaje, resaltando también que este es el primer reporte en cuanto a la caracterización del aceite esencial de la especie objeto de estudio.

En cuanto al análisis fitoquímico preliminar, se logró determinar la posible presencia de metabolitos con núcleos del tipo alcaloide, flavonoide, triterpeno, taninos y compuestos aromáticos.

Referencias

1. Bruneton J.: Farmacognosia Fitoquímica – plantas medicinales. 2a edición. Editorial ACRIBIA. Zaragoza España. (2001).
2. Ministerio de protección social.: Vademécum de plantas medicinales aprobadas en Colombia.
3. Lock de Ugaz, O.: Capítulo IV. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Pontificia Universidad Católica del Perú.
4. Bilbao, M.: Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío. Facultad de ciencias básicas y tecnologías. Armenia, (1997).
5. Puentes, L.: Estudio Químico de algunos de los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *Raputia heptaphylla* (RUTACEAE) [Tesis de grado]. Bogotá: Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia; (2005).
6. de Souza, J., Arruda, A., Muñoz, G., Arruda, M., Muller, A.: Prenylated flavones from *Neoraputia paraensis*. *Phytochemistry*, 52(8):1705-9. (1999).
7. Passador, E., Fatima, Das G. M., Da Silva, F., Rodrigues, E., Fernandes, J., Vieira, P., Pirani, J. A.: Pyranochalcone and a flavanone from *Neoraputia Magnifica*. *Phytochemistry*, 45(7):1533-7. (1996).
8. Tomazela, D., Pupo, M., Passador, M., da Silva, M., Vieira, P., Fernandes, J., et al.: Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*, 55(6):643-51. (2000).
9. Bakhtiar, A., Gleye, J., Moulis, C., Foraste, I.: C-Glycosyl flavones from *Raputia paraensis*. *Phytochemistry*, 30(11):3840-1. (1991).
10. Vieira, LV., Moura, T., das GFMF, Fernandes, JB., Vieira, PC., Oliva, G, et al.: Novo alcalóide bisindol de *Raputia pratermissa* Emmerich (Rutaceae) e sua importancia quimiosistemática; XXIV Reunião anual sobre Evolucao, Sistemática e ecologia micromoleculares. Instituto de Química, Universidade Federale de Fluminense, 21. (2004).
11. Vougiopoulou, K., Fokialakis, N., Aligiannis, N., Cantrell, C., Skaltsounis, A.: The raputindoles: Novel cyclopentyl bisindole alkaloids from *Raputia simulans*. *Organic Letters*, 12(9):1908-1911. (2010).
12. Coy Barrera, C. A., Coy Barrera, E. D., Granados Falla, D. S., Delgado Murcia G., Cuca Suarez, L. E.: Seco-limonoids and quinoline alkaloids from *Raputia heptaphylla*

- and their antileishmanial activity. *Chemical Pharmaceutical and Bulletin* 59(7):855-9. (2011).
13. Gibbons, S.: Anti-staphylococcal plant natural products; *Natural Products Research*, 21: 263-277. (2004).
 14. Gibbons, S.: Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents; *Phytochemistry Reviews*, 4:63-78. (2005).
 15. Etteghad, S.S., Mirzaei, H., Pour, S.F., Kahnaui, S.: Inhibitory Effects of endemic, *Thymus vulgaris* and *Menta piperita* Essential Oils on *Escherichia coli* O157:H7, *Research Journal of Biology Science*, 4(3); 340-344. (2009).
 16. Jarrar, N., Abu-Hijleh, Adwan K.: Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 121-123. (2010).
 17. Goodner, K. L.: Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 951-958. (2008).
 18. Adams, R. P.: Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, USA, pp. 3-436. (1995).