

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DEL
ACEITE ESENCIAL DE LA ESPELETIA SCHULTZII**

A. USOBILLAGA y G. de CASTELLANO
Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes
Mérida, Venezuela

RESUMEN

La *Espeletia schultzii* es un frailejón típico de muchos páramos venezolanos. Se obtuvo el aceite esencial sometiendo la resina a destilación por arrastre con vapor. La esencia examinada mediante cromatografía de gases sobre una columna de carbowax 20M presenta 34 picos, pero dos de ellos representan alrededor del 70% de la esencia. Mediante percolamiento sobre columna seca de sílica gel se separó la esencia en 5 fracciones de diferente polaridad. En la primera fracción se identificó las dos sustancias mayoritarias como α y β -pineno mediante un estudio combinado de cromatografía de gases-espectrometría de masas. Este resultado fue confirmado mediante un espectro de resonancia de carbono-13 del aceite esencial, por esta técnica se pudo además observar que el aceite esencial de la planta fresca recolectada en diversos páramos no muestra diferencias en su composición.

ABSTRACT

Contribution to the study of the essential oil of *Espeletia schultzii*. *Espeletia schultzii* is a compositae endemic to many Venezuelan paramos. From the resin of this plant the essential oil was obtained by steam distillation.

It was inspected by gas chromatography on a carbowax 20M column and showed 34 peaks, two of them represent around 70% of the essence.

It was treated on a dry silicagel column and five fractions of different polarity were obtained. The first fraction contained the two mayor components which were identified by GC-MS analysis as α and β -pinene. This finding was confirmed by the C-13 spectrum of the essential oil. CMR analysis permitted comparison of the essential oils obtained from fresh plants collected at different paramos. No differences in composition were found.

INTRODUCCION

Los frailejones son plantas resinosas típicas de los Páramos del Norte de Ecuador, Colombia y Venezuela. Pertenecen a la familia de las Compuestas y han sido clasificadas botánicamente en siete géneros distintos (1).

Algunas de estas plantas han sido estudiadas en los últimos años (2-7), encontrándose que contienen diterpenos del tipo kaurano. Los frailejones poseen un olor característico porque contienen sustancias volátiles, generalmente en mezclas sumamente complejas. En el presente trabajo se informa

sobre la identificación de dos componentes mayoritarios de la esencia obtenida de la resina de *Espeletia schultzei*, un frailejón ampliamente distribuido en los Andes Venezolanos. Esta resina es producida por la planta como respuesta al ataque de una mariposa nocturna y solamente es posible recolectarla en los meses de verano.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo la resina el mes de abril en el Páramo de Santo Domingo. El material recolectado se dividió en pequeños trozos y se sometió a destilación por arrastre con vapor. La esencia se recogió en un colector y se dejó sobre sulfato de sodio para eliminar la humedad. El peso específico (0.887 g/cm^3) y el índice de refracción (1.463) sugieren un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos (8). A la misma conclusión se puede llegar si se considera su baja solubilidad en mezclas etanol-agua con un contenido de agua mayor del 5%.

La cromatografía de gases proporcionó valiosa información sobre el número de componentes y su abundancia relativa. Se realizó el análisis sobre una columna de carbowax 20M al 10% sobre soporte de diatomita C con aumento lineal de la temperatura de 30 a 180°C. Se observaron 34 picos tal como se puede apreciar en la Figura 1. Las columnas de relleno no son tan eficientes como las columnas capilares para separar mezclas complejas de este tipo. Es muy probable que si la esencia se hubiera analizado sobre una columna capilar, se hubiera podido observar un número mayor de componentes. Sin embargo el análisis realizado sobre la columna de carbowax permitió deducir que la esencia de la *Espeletia schultzei* está constituida en un 68-75% por solamente dos sustancias. En la figura 1 están señalados los picos del número 1 al 34; un parámetro muy importante en este cromatograma es la atenuación. Los picos 1 a 4 están atenuados cinco mil veces, del pico N° 5 al N° 20 la atenuación es 200 y a partir del pico N° 20 la atenuación es 100. Esto quiere decir que, por ejemplo, la sustancia correspondiente al pico N° 3 cuya señal aparece con tamaño aproximadamente igual al pico N° 20, es sin embargo unas 25 veces más abundante.

Se calculó el área de cada pico mediante triangulación y de este cálculo se pudo inferir que la sustancia N° 2 constituye entre el 50 y el 55% de la esencia; así mismo se calculó que la sustancia N° 3 representa entre un 18 y 20% de la mezcla. El cálculo de las concentraciones relativas es solamente aproximado porque se utilizó un detector de ionización de llama y no se

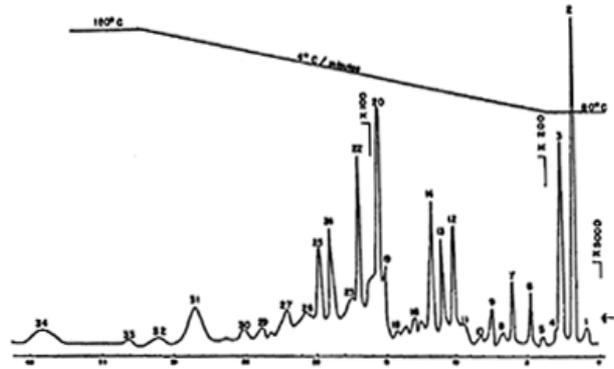


FIG. 1. CROMATOGRAMA DE LA ESENCIA DE ESPELETIA SCHULTZEI

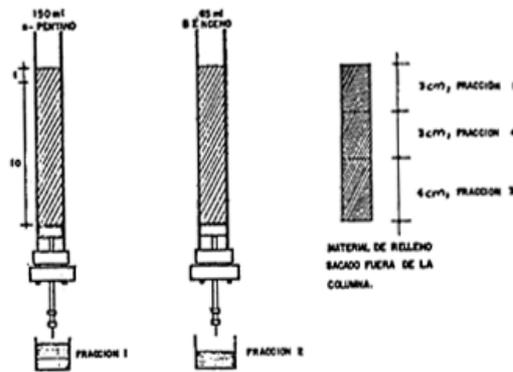


FIG. 2. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA SECA DEL ACEITE ESENCIAL

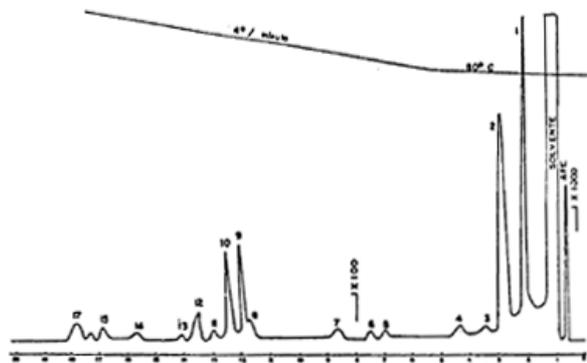


FIG. 3. CROMATOGRAMA DE LA 1ª FRACCION (HIDROCARBUROS)

calcularon factores de respuesta para cada componente, lo cual sería muy difícil de ejecutar en una mezcla tan compleja.

Con el objeto de separar el aceite esencial en fracciones de diferente polaridad se decidió utilizar cromatografía sobre columna seca (9). Esta separación está esquematizada en la figura 2. Se aplicó 2 ml de una solución al 10% del aceite esencial en n-pentano, a la parte superior de una columna de sílicagel y se percoló la columna con 150 ml. de pentano. Esta primera fracción constituida por hidrocarburos se analizó mediante cromatografía en fase gaseosa en condiciones iguales a las usadas para el aceite esencial. El resultado de este análisis se observa en la figura 3. El cromatograma de la primera fracción muestra un total de 17 sustancias y las dos más abundantes producen los picos 1 y 2 que representan más del 95% de la fracción soluble en pentano. Sin duda alguna son las mismas sustancias que aparecen como picos 2 y 3 en el cromatograma de la mezcla total.

La columna de sílicagel se eluyó luego con benceno y se obtuvo así la segunda fracción que debe estar constituida por ésteres (9). En la figura 4 se puede apreciar el cromatograma de esta fracción que muestra un total de 18 picos. En este caso se usó para los primeros dos picos atenuación de 500 y de allí en adelante atenuación 20. Tomando en consideración que los picos 1 y 2 son muy pequeños se llega a la conclusión de que todos los componentes de esta fracción están en el mismo rango de concentración.

En vista de que los componentes más polares del aceite esencial quedan retenidos en la sílicagel se empujó el relleno fuera de la columna de vidrio con ayuda de un émbolo, se dividió la sílicagel en tres partes según se indica en la figura 2 y se extrajo cada una con mezcla de éter-etanol (8+2). El filtrado de cada fracción se agitó con agua para remover el metanol y la capa etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro. La fracción 3 también debe contener ésteres, la fracción 4 aldehídos y cetonas, la fracción 5 alcoholes. Los cromatogramas en fase gaseosa de estas fracciones se presentan en las figuras 5, 6 y 7 respectivamente. La atenuación es constante a lo largo de cada uno de estos cromatogramas, por consiguiente los componentes de cada una de estas fracciones tienen el mismo rango de concentración.

Si se suma el número de componentes observados en las cinco fracciones se obtiene un total de 77 sustancias, lo que es más del doble del número de sustancias observadas en el cromatograma del aceite esencial (Fig. 1). Es posible que algunas sustancias estén presentes en más de una fracción, sin

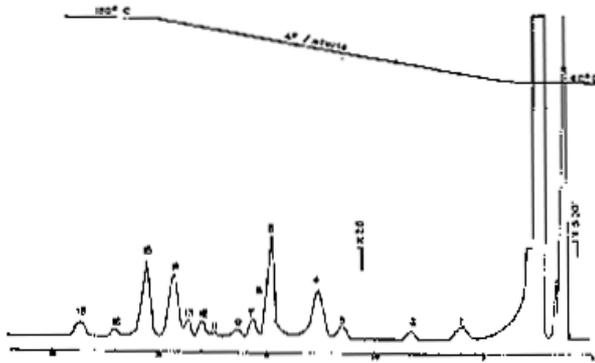


FIG. 4. CROMATOGRAMA DE LA 2ª FRACCION (ESTERES)

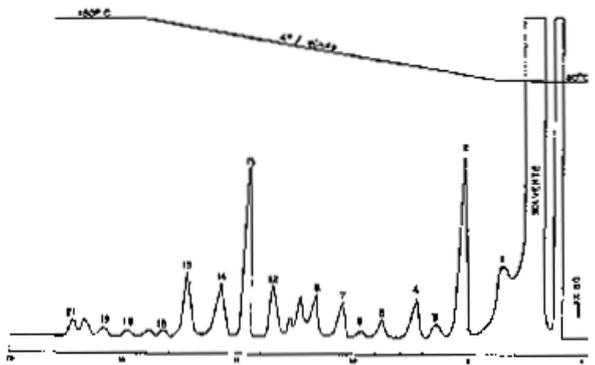


FIG. 5. CROMATOGRAMA DE LA 3ª FRACCION (ESTERES)

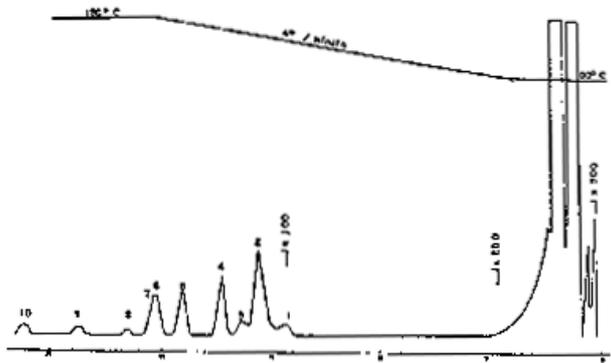


FIG. 6. CROMATOGRAMA DE LA 4ª FRACCION (ALCOHOLIOS Y CETONAS)

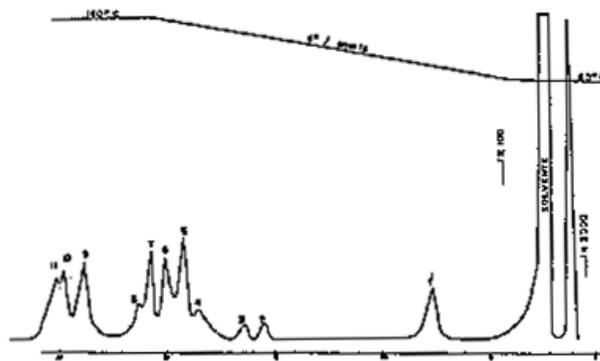


FIG. 7. CRONATOGRAMA DE LA 5ª FRACCION (ALCOHOLOS)

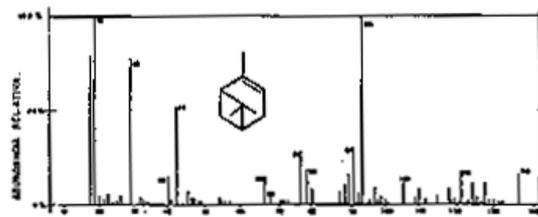


FIG. 8a. ESPECTRO DE MASAS DEL α -PINENO.

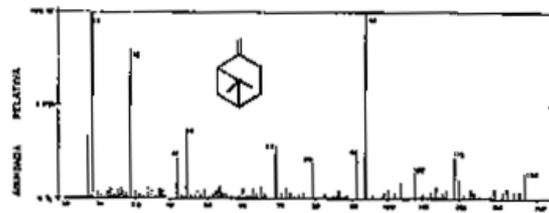


FIG. 8b. ESPECTRO DE MASAS DEL β -PINENO.

embargo lo más probable es que en el cromatograma de la esencia completa, haya solapamiento de señales y por consiguiente se puede afirmar que el número total de componentes debe ser mucho mayor de 34. La manera más adecuada de resolver esta interrogante sería correr una muestra en una columna capilar.

Con el objeto de identificar los componentes mayoritarios del aceite esencial se corrió una muestra de la primera fracción en un espectrómetro de masas en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) se utilizó un espectrómetro modelo GNOM 111 de Varian que tiene acoplado un cromatógrafo de gases. Se utilizó una columna de carbowax 20M similar a la utilizada en Mérida, sin embargo no se obtuvo la misma resolución y en el detector de iones (TID) del espectrómetro de masas solamente se observaron los picos correspondientes a las dos sustancias mayoritarias. Las figuras 8a y 8b son una representación de los fragmentos más importantes observados en los espectros de masas de las sustancias 1 y 2 respectivamente.

Los hidrocarburos monoterpénicos son moléculas pequeñas con estructuras isoméricas $C_{10}H_{16}$, $C_{10}H_{18}$ y $C_{10}H_{16}$, razón por la cual sus espectros de masas son muy similares y generalmente se observan los mismos fragmentos. Sin embargo es posible diferenciarlos en base a su abundancia relativa como lo demuestran estudios realizados por algunos investigadores (10-14).

En el caso que nos ocupa fue posible identificar la sustancia 1 (fracción de n-pentano) como α -pineno y a la sustancia 2 como β -pineno al comparar sus respectivos espectros de masas con los valores publicados por Thomas y Wilhelm (10) que se presentan en la Tabla 1.

Este resultado fue confirmado adicionando una pequeña cantidad de α -pineno y β -pineno al aceite esencial y observado el aumento relativo de sus respectivos picos en el cromatograma. Las fracciones 2 a 5 también fueron examinadas en el espectrómetro de masas, sin embargo no fue posible identificar ningún otro componente.

Recientemente se está aplicando la resonancia magnética nuclear de carbono-13 al estudio de los aceites esenciales (14).

TABLA 1

ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS FRAGMENTOS EN LOS ESPECTROS DE
MASAS DEL α -PINENO (a) Y β -PINENO (b) SEGUN THOMAS Y WILLHALM

m/e	136	121	107	105	94	93	92
a	8	14	5	8	3,5	100	30
b	8.5	10	4	2	10	100	8
m/e	91	79	77	69	67	55	41
a	24	17	22	-	6.5	5	14
b	15	18	17	36	8	5.5	40

Las señales utilizadas en el espectro de la esencia de *Espeletia schultzzi* corresponden a los carbonos del α y β pineno como se puede apreciar en la figura 9. La resonancia de C-13 permite inspeccionar con rapidez y en forma no destructiva la composición de los aceites, se necesita no más de 0,5 ml. de muestra. A solicitud el grupo de Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias se comparó mediante esta técnica el aceite esencial de especímenes de *Espeletia schultzzi* recolectados en diversos páramos a objeto de comprobar si las diferencias en altitud afectaban su composición. Los resultados indican que la composición no varía. En cambio si se pudo observar que el aceite esencial extraído del frailejón fresco (Fig. 10) contiene un mayor número de componentes que el aceite obtenido de la resina exudada por la planta. En el aceite esencial obtenido de la planta fresca se observa una composición más compleja, esto se debe a que la resina pierde algunos componentes minoritarios por evaporación.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección y Extracción

La resina de *Espeletia schultzzi* (Especimen Testigo N° 2256 conservado en el Departamento de Botánica de la Facultad de Farmacia), se recogió en abril en el páramo de Santo Domingo. Se logró recolectar un total de 1,95 Kg. Este

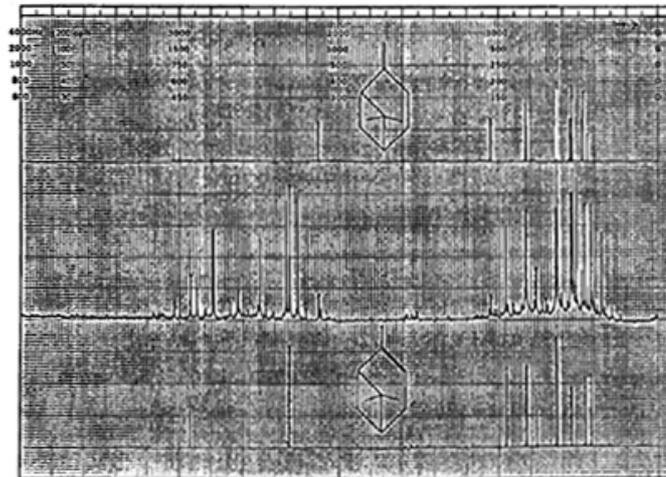


FIGURA 9.-ESPECTRO DE C-13 DEL ACEITE ESENCIAL COMPARADO CON EL ESPECTRO α -PINENO(INFERIOR) Y β -PINENO(SUPERIOR)

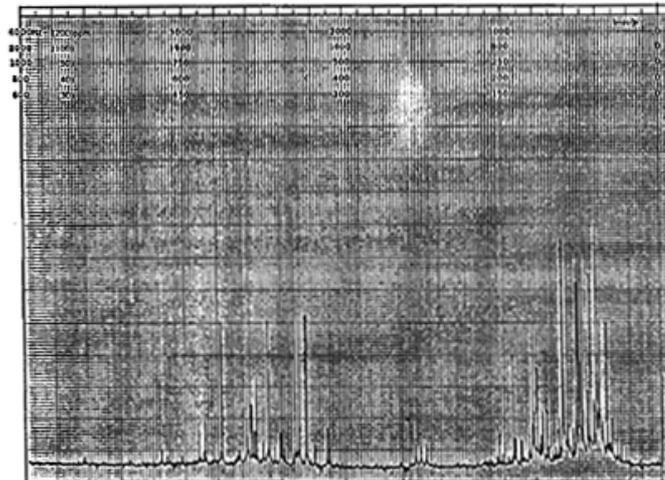


FIGURA 10.-ESPECTRO DE C-13 ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA FRESCA.

materia se desmenuzó y se puso en un balón de 12 lt. de capacidad y se hirvió con agua al reflujo durante tres días. La esencia se escogió mediante un colector (Catálogo Pyrex N° 3532), encima del cual se instaló un refrigerante de tipo Liebig de 1 mt. de largo. Al principio la condensación de esencia fue muy rápida y fue preciso detener la destilación cada dos o tres horas para retirar ésta del brazo graduado con una pipeta. Se recolectó un total de 65,5 cm³ de esencia que se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Se obtuvo un rendimiento de esencia de 33,6 cm³/kg.

Determinación de algunas constantes físicas.

Peso específico: Se midió un picnómetro de aproximadamente 25 cm³ a una temperatura de 20°C. El peso del picnómetro vacío fue de 23,2120 gr, lleno de agua 48,0928 gr. y lleno de aceite esencial 45,2278 gr.

Como el peso específico del agua destilada a 20° es de 0,9982 gr/cm³ (22) se calculó para el picnómetro un volumen de 24,8255 cm³. De estos datos se calculó para el aceite esencial una densidad de 0,8868.

Rotación Óptica: Se midió en un polarímetro Zeiss, modelo LEP A7 a 546 y 578 nm. Se utilizaron tubos de 10 cm. de largo. Se puso el aceite en el tubo de medición a temperatura de 25°C sin emplear ningún solvente. Se calibró el punto cero con el tubo vacío. Se obtuvo lecturas de -36,55° a 546 nm y -45,00° a 578 nm. A partir de estos datos se calculó el ángulo de rotación a 589 nm (16) obteniéndose un valor de -55,48°.

Índice de refracción: Se midió en un refractómetro Abbe a 25°C. Se obtuvo un valor de 1,463.

Solubilidad en alcohol: Los aceites esenciales son escasamente solubles en agua y miscibles en alcohol absoluto.

Se midió un cc. de aceite esencial en un cilindro graduado con tapa de 10 cm³, agregando alcohol lentamente en pequeñas proporciones y a diferente dilución, agitando después de cada adición hasta completar un volumen de 10 cc.

El aceite esencial en alcohol 95% es completamente soluble. En alcohol 90% se logra la solubilidad con un volumen de 3,5 cc. En alcohol 85% es poco soluble y en alcoholes de menor fuerza es totalmente insoluble.

Cromatografía sobre columna seca: Este método permite separar la muestra de aceite esencial en cinco fracciones de diferente polaridad. La fracción 1 se obtuvo por percolación de la columna con n-pentano; la fracción 2 por percolación con benceno y las otras fracciones se obtuvieron dividiendo la columna en tres segmentos de acuerdo al esquema de la figura 2, que se extrajeron con una mezcla de éter etílico y metanol.

Se utilizó una columna de vidrio para cromatografía de 25 mm de diámetro interno, representada en la figura 2.

Se pesaron 45 gr de silicagel, que se compactó por vibración hasta una altura de 10 cm. de la columna medidos desde la base. Se tomaron 2 ml. de solución al 10% de aceite esencial en n-pentano y se aplicó al tope de la columna que se recubrió luego con una capa de 1 cm. de silicagel. Por elución de la columna con 150 ml de n-pentano, se obtuvo la fracción 1, la fracción 2 se obtuvo por elución con 65 ml. de benceno. Una vez percolado todo el benceno, la columna se fraccionó en tres segmentos a partir de la base a una proporción 4:3:3, con la ayuda de una espátula se sacó el relleno separando así las tres zonas que correspondían a las fracciones 3, 4 y 5 según esquema de la figura 2, cada una se suspendió en 10 ml. de una mezcla éter-metanol (8+2) para extraer las sustancias absorbidas por el silicagel. Se filtró y se lavó el silicagel con 30 ml de la mezcla éter-metanol. El filtrado de cada fracción se agitó dos veces con 40 ml de agua para remover el metanol y la fase etérea se secó con Na_2SO_4 . Las fracciones así obtenidas se concentraron a 2 ml.

Cromatografía de gases: Para el análisis de las fracciones obtenidas de la columna de silicagel se utilizó un cromatógrafo de gases, marca Perkin Elmer, modelo 280, provisto de un detector de ionización a llama. Se usaron columnas de acero inoxidable de seis pies de largo (1,83 m) y un octavo de pulgada de diámetro interno. En todas las experiencias realizadas se utilizó helio como gas portador, a una presión de entrada de 50 libras por pulgada cuadrada (50 psig. = 3,4 atm) con un flujo de 25 $\text{cm}^3/\text{minuto}$. En el detector se usó hidrógeno con un flujo de 60 $\text{cm}^3/\text{minuto}$ y aire a razón de 550 $\text{cm}^3/\text{minuto}$ para ambas columnas (de análisis y referencia). Se ensayaron algunas fases estacionarias recomendadas en la bibliografía (25, 26): SE-30 al 5%, UCON LB-550 al 15%, Apiezon L al 5%, Carbowax 20M al 5, 10 y 15%. Se encontró que la fase estacionaria más adecuada es carbowax 20M al 10% sobre Diatomita C, 80/100 mesh, silanizada.

Las condiciones que se utilizaron para todos los cromatogramas fueron:

Temperatura del detector: 140°C
 Temperatura inicial del horno: 80°C durante 3 minutos
 Programa de temperatura: 4°C por minuto
 Temperatura máxima del horno: 180°C
 Temperatura del detector: 150°C (el detector está ubicado dentro del horno y la temperatura varía al variar la temperatura del horno).

Se utilizó un registro marca Leeds & Northrup, modelo Speedomax G con una velocidad de media pulgada (12,5 mm) por minuto.

Espectrometría de masas:

Se utilizó un espectrómetro de masas marca Varian-MAT, modelo GNOM 111. Se obtuvo permiso para utilizar el instrumento del laboratorio de Catálisis del Centro de Petróleo y Química del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, IVIC. Dicho aparato está dotado de un cromatógrafo de gases Varian, modelo 1400 y tiene un rango de masa de a.e.u. 1000.

Para uso en el cromatógrafo de gases incorporado al espectrómetro de masas se preparó en Mérida una columna cromatográfica de acero inoxidable de 1,83 m. de largo y un octavo de pulgada de diámetro interno, con carbowax 20M al 10% en condiciones exactamente iguales a las usadas para las columnas preparadas para el cromatógrafo Perkin Elmer. En el IVIC se empleó helio como gas portador a un flujo de 60 cm³/minuto. Se utilizó como detector un detector total de iones (TID) incorporado al espectrómetro de masas. Para todos los espectros de masas se usó un potencial de ionización de 70 eV. El espectrómetro de masas se calibró contra el pico del agua. Se utilizó un rango de masas de amu 200 y en algunos casos amu 300. Los espectros de masas se toman al entrar las sustancias en la cámara de ionización, observando los picos del registrador asociado al TID. Los espectros de masas se registraron en papel UV sensible en el L.B.O. asociado al espectrómetro de masas.

Resonancia Magnética Nuclear de C-13

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 se midieron en un espectrómetro Varian de pulsos, modelo FT-80-A a 20 Mega Herz en solución de deuterocloroformo utilizando tetrametilsilano como referencia interna. La medición se hizo en tubos de 5 mm de diámetro mezclando 0,35 cc de

aceite esencial y 0,15 cc de CDCl_3 . Los parámetros de análisis fueron los siguientes:

Anchura espectral	5000 H_3
Anchura del pulso	30°
Tiempo del pulso	1.6 segundos
Memoria	16/24 K
Número de pulsos	entre 30.000 y 50.000
Temperatura	31°C
T0 (offset del transmisor)	45
D0 (offset del desacoplador)	50
Anchura del gráfico	0-200 ppm.

REFERENCIAS

- <1> CUATRECASAS Y.; *Phytologia*, 35(1), 43-61 (1976)
- <2> USUBILLAGA A., MORALES MENDEZ A.; *Revista Latinoamericana de Química*, 1, 126-131 (1977)
- <3> BRIESKORN C.H. y POHLMANN E.; *Tetrahedron Letters*, 54, 5661-5664 (1968)
- <4> PIOZZI F., PASSANNANTI S. y PATERNOSTRO M.P.; *Phytochemistry*, 10, 1164-1166 (1971)
- <5> USUBILLAGA A. y NAKANO T.; *Planta Médica*, 35(4), 331-8 (1979)
- <6> BOHLMANN F., SUDING H., CUATRECASAS Y., KING R.M. y ROBINSON H.; *Phytochemistry*, 19, 267-271 (1980)
- <7> BOHLMANN F., SUDING H., CUATRECASAS J., KING R.A.; *Phytochemistry*, 19, 2399-2403 (1980)
- <8> DOMINGUEZ X.A.; *Métodos de Investigación Fitoquímica*, pag. 229, Limusa México (1972)
- <9> KUBEZCKA K.H.; *Chromatographia*, 5(2) 106-108 (1973)
- <10> RYDAGE R. y VON SYDOW E.; *Acta Chem. Scand.* 17, 2025 (1963)
- <11> VON SYDOW E.; *Acta Chem. Scand.* 17, 2504 (1963)
- <12> VON SYDOW E.; *Acta Chem. Scand.* 18, 1099 (1964)
- <13> THOMAS A.F. y WILHALM B.; *Helv. Chim. Acta*, 47, 474 (1964)

- <14> VON BUNAU G., SCHADE G. y GCLIMICK K.; Z. Anal. Chem. 227, 270 (1957)
- <15> FORMACEK V. y KUBEČKA K.H.; Essential oil analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR spectroscopy, John Wiley & Sons, New York, (1982)