

Artículo original

Extracción y caracterización de componentes terpenoidales de la resina de *Vismia macrophylla* Kunth

[Extraction and characterization of terpenoid components from *Vismia macrophylla* Kunth resin]

Cleto Jara Herrera^{*1}, Frank León Vargas^{2,3} Kosseth Marianella Bardales Grández²,
Víctor García Pérez², Walter Moreno Eustaquio⁴

1. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Facultad de Farmacia y Bioquímica. Av. Grau 1072, Iquitos, Loreto, Perú. Correo electrónico: cletotojara@gmail.com (C. Jara * Autor para correspondencia).
2. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Facultad de Ingeniería Química. Av. Grau 1072, Iquitos, Loreto, Perú. Correos electrónicos: frarolevar@hotmail.com (F. León), koma2326@hotmail.com (K. M. Bardales), vgp_57@hotmail.com (V. García).
3. Universidad Científica del Perú (UCP). Facultad de Ciencia e Ingeniería. Av. Quiñonez km 2,5, San Juan Bautista, Loreto, Perú.
4. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Facultad de Ingeniería Química. Av. Juan Pablo II s/n, Trujillo, La Libertad, Perú. Correo electrónico: wmorenoe255@hotmail.com (W. Moreno).

Resumen

Vismia macrophylla Kunth es una planta amazónica, que contiene una resina coloreada propia de la familia Hypericaceae secularmente utilizado por los nativos amazónicos para tratamiento de hongos. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar los terpenoides de *Vismia macrophylla*. La muestra fue recolectada en el caserío de Nina Rumi, cuenca media del río Nanay, en la Amazonía peruana. La extracción de sus componentes terpenoidales se realizó usando como fluido supercrítico el CO₂ y su caracterización mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se obtuvieron trece componentes, siendo los más importantes por su abundancia porcentual el terpen-4-ol (36,08 %), α -terpineol (21,46 %), α -eudesmol (16,89 %), α -copaeno (8,89 %) y alcanfor (3,99%). La identificación de estos compuestos terpenoidales servirá para posteriormente relacionarlos a alguna actividad biológica.

Palabras clave: Cromatografía de gases, Fluido súper crítico, Terpenoides.

Abstract

Vismia macrophylla Kunth is an amazonian tree that contains a colored resin typical of the Hypericaceae family which is commonly used by the amazonian natives to treat fungi. The objective of this work was to isolate and characterize the terpenoids of *Vismia macrophylla*. The sample was collected in the village of Nina Rumi located in the mid basin of the Nanay river, in the Peruvian Amazon. The extraction of the terpenoid components was carried out using CO₂ as a supercritical fluid and its characterization by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. Thirteen components were obtained, the most important being terpen-4-ol (36,08%), α -terpineol (21,46%), α -eudesmol (16,89%), α -copaene (8,89%) and camphor (3,99%). The identification of these terpenoid compounds will serve to later relate them to some biological activity.

Keywords: Gas chromatography, Super critical fluid, Terpenoids.

INTRODUCCIÓN

Especies de la familia Hypericaceae son de gran interés por presentar diversas actividades biológicas; se le conoce tres tribus, siendo relevante la tribu Hypericeae con 24 especies encontradas en la Amazonía y la tribu Vismieae donde destaca el género *Vismia* con 75 especies ubicadas en el neotrópico, de las cuales 30 especies habitan en la Amazonía (Poletto, 2021 y Hussain et al., 2012).

En una revisión bibliográfica se señala que las especies del género *Vismia* contienen metabolitos secundarios principalmente derivados quinónicos y terpénicos; también se encuentran flavonoides, lignanos y coumarinas (Álvarez et al., 2008). Este espectro amplio de metabolitos secundarios ha convertido a este género en fuente de medicina alternativa para tratar afecciones bacterianas, fúngicas, urinarias, enfermedades de la piel, Alzheimer, entre otras.

Respecto al género *Vismia* se ha realizado varios estudios que evidencian la existencia de numerosos componentes con propiedades medicinales; convirtiendo a este género en fuente alternativo de compuestos bioactivos, que pueden ser utilizados para tratar muchas afecciones y enfermedades que aquejan a la humanidad (Vizcaya et al., 2014).

De las bayas frescas de *Vismia baccifera*, *V. ferruginea* y *V. guianensis* en Antioquia, Colombia; se ha aislado antranoides prenilados ferruginina A, γ -hidroxiferruginina A y vismiaquinona A; se considera que estos compuestos antioxidantes tienen potencial aplicación en la industria de los alimentos y la industria farmacéutica (Álvarez et al., 2008). Vizcaya et al. (2014), obtuvo el aceite esencial de la corteza del tallo de *V. baccifera* en Mérida, Venezuela, e identificó 13 componentes, los más abundantes fueron: óxido de cariofileno, β -cariofileno, α -zingibereno y α -humuleno. Del extracto acuoso de hojas de *V. baccifera* encontraron (-) - monómeros dímeros y trímeros de icatequina, y quercetina y el componente principal fue flavanol epicate-

quina (Trepiana et al., 2018). En dos muestras de *V. baccifera* de diferente procedencia de la zona de la sierra venezolana se encontraron: en una de las muestras 10 componentes, siendo los más abundantes β -cariofileno, α -humuleno, germacreno-D y en la otra muestra 16 componentes siendo mayoritarios trans-cariofileno, β -elemeno, α -humuleno y eremofileno (Rojas et al., 2020). Este resultado indicaría una diferencia en la composición de una misma especie, dependiendo de su procedencia.

En Brasil se reportó la existencia de componentes terpenoidales de *Vismia guianensis* (Silvestri, 2012; Vizcaya et al., 2012) y de las hojas y corteza se reportó dos componentes O-glucosil-flavonoides y 16 derivados de benzofenona prenilados (Oliveira et al., 2017). De la raíz y hojas de *Vismia laurentii* se aislaron cinco componentes 3-geranyloxyemodine, Vismiaquinone B, 3-methoxyemodine, 2-isoprenyl-3-methoxyemodine y Bivismiaquinone (Kemegne et al., 2017). Del extracto hexánico de las hojas de *Vismia gracilis* se ha aislado ocho compuestos, 4 benzofenonas: clusiafenona A, isovismiafenona B, myrtiaphenone B y un derivado de clusiafenona, y 4 antraquinonas: crisofanol, physcion, vismiaquinona y vismiaquinona D (Magalhaes et al., 2021).

De la especie *V. macrophylla* de interés en el presente estudio, de las hojas se ha reportado 24 componentes y de los frutos 31 componentes; siendo los principales Germacreno D, δ -cadineno, γ -bisaboleno y β -bisabolol (Buitrago et al., 2015) y la existencia de antronas, pequeñas cantidades de glicosidos, flavonas, dehidroflavonas y flavonoles (Buitrago et al., 2016). En un estudio reciente en Venezuela, Rojas et al. (2020) encontraron en *V. macrophylla* 24 componentes, los principales fueron el γ -bisaboleno y β -bisabolol.

En cuanto a los componentes terpenoidales existen muchos estudios cuyo interés ha estado orientado a dilucidar la composición de aceites esenciales de plantas, (Juárez et al., 2010, An et al., 2018; Policegoudra et al., 2012), se observa que estos compuestos son de estructura

aromática y como tales están orientados a los propósitos de industria perfumista y cosmética. Hoy en día, existe un gran interés por la búsqueda de fuentes naturales para tratar enfermedades, por lo tanto, los resultados se consideran como una contribución a la investigación de productos naturales.

El objetivo de la presente investigación fue aislar componentes terpenoidales de naturaleza bioactiva por fluido supercrítico con CO₂ y caracterizar por cromatografía de gas y espectrometría de masas de resina de *V. macrophylla* del bosque de la localidad de Nina Rumi, San Juan, Loreto, Perú.

MATERIALES Y MÉTODO

Recolección de muestras y separación de impurezas del látex

Las muestras de resina de *V. macrophylla* fueron recolectadas en la cuenca media del río Nanay en el caserío de Nina Rumi, distrito San Juan Bautista, Provincia Maynas, Región Loreto, Perú; cuyas coordenadas geográficas son: 3° 50' 29,98" S y 73° 22' 00,23" O, con una altitud aproximada de 97 msnm (Figura 1). La identificación taxonómica de la especie estudiada se llevó a cabo en el Herbario Amazonense (AMAZ-CIRNA-UNAP, Perú, Iquitos). La muestra permanente se registró con el N° 039199.

Para recolectar la resina, se seleccionaron árboles entre 15 cm a 20 cm de diámetro del tallo con alturas que fluctúan entre 10 m y 18 m, el área donde se recolectó la muestra es bosque secundario y arenoso. Las muestras se recolectaron en el mes de octubre del año 2019. Se realizó incisiones en la corteza del tallo de diez árboles, una vez realizada las incisiones se dejaron aproximadamente tres o cuatro días para que el látex se acumule y se solidifique, después del cual se recolectaron las muestras en envases de plástico y almacenados a temperatura ambiente. Para separar las impurezas que están adheridas al látex con la corteza de la planta, las muestras se diluyeron en etanol absoluto, luego se filtró con papel filtro What-

man N° 41 con las que separó las impurezas, el solvente se separó en rotavapor a presión reducida de 25 mbar y 40 °C, posteriormente el solvente remanente se separó en una estufa a 40 °C quedando la resina puro.

Preparación de la muestra de resina de *V. macrophylla* para la extracción

Para la extracción de componentes terpenoidales se utilizó CO₂ de 100 % de pureza (Dióxido de carbono industrial CO2 UN 1013 ISO 14175 C1, MESSER). El etanol empleado como cosolvente fue de grado para cromatografía líquida (HPLC) marca Merck. A la resina previamente purificada se sometió al secado en frío a - 5 °C en un congelador por 6 horas aproximadamente, para que esté en condiciones para la molienda. Luego se procedió a moler el material en mortero hasta conseguir un tamaño uniforme de partícula, posteriormente se tamizó con un tamiz N° 70, y luego se colocó en la cámara de extracción por fluido super crítico.

Extracción cualitativa de componentes terpenoidales por fluido supercrítico con CO₂

Las extracciones con fluido supercrítico se realizaron en un equipo JASCO SFE, equipado con un regulador automático contrapresión BP 4340, una Bomba de Solvente PU 4086, una bomba para el CO₂ PU 4386, y un horno de columna CO 4065. También se usó una cámara de extracción con capacidad de 5, 10 y 15 cm³ y un sistema de separación y recolección de los extractos. Con la información proporcionado por Lack y Simandi (2001) y Uribe *et al.* (2011), se hizo la programación del equipo: Tiempo de flujo del CO₂ una hora a través de la cámara de extracción, presión en la cámara de extracción 3200 PSI (220 bar) y temperatura de la cámara de extracción 40°C. También se usó como cosolvente del CO₂ el etanol absoluto relación 90:10 (V/V).

Caracterización de componentes terpenoidales

Se realizó mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La identificación de los metabolitos secundarios en el ex-

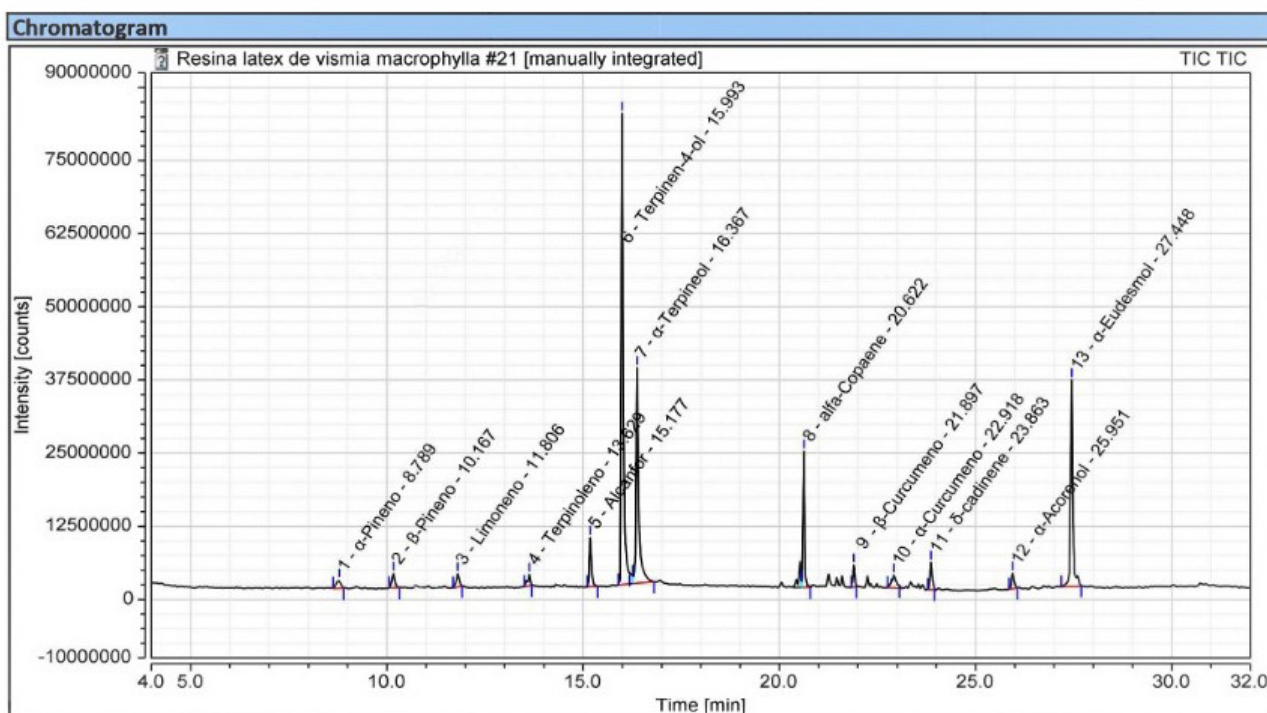


Figura 2. Cromatograma de los componentes terpenoidales extraídos de la resina de *V. macrophylla* procedente de Nina Rumi, Loreto, Perú.

tracto obtenido con fluido supercrítico con CO₂ se realizó en un cromatógrafo de gases marca Thermo Scientific modelo Trace 1300 acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple modelo ISQ QD marca Thermo Scientific con un sistema de cómputo y una columna capilar TG-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de película). En el horno del cromatógrafo, la temperatura inicial fue de 45 °C por 5 minutos, la cual se aumentó hasta 150 °C durante 2 minutos a razón de 6 °C/min y después desde 150 °C hasta 200 °C a razón de 8 °C/min durante 2 min. El inyector en modo split, (split flow 30 mL/min.; split ratio 60; purg flow 5 ml/min). El flujo del gas portador (He) fue 0,5 mL/min. La temperatura de la línea de transferencia fue de 150 °C y la cámara fuente de iones se mantuvo a 230 °C, los iones fragmentados en los espectros de masa se obtuvieron por impacto con electrones de energía de ionización de 70 eV y se registraron en un rango de masas (m/z) entre 45 y 450. Para el proceso se inyectó 1 µL de muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Extracción por fluido supercrítico de componentes terpenoidales de resina de *V. macrophylla*

A las condiciones de extracción establecidas se logró aislar cualitativamente los componentes terpenoidales de la resina de *V. macrophylla*. No se determinó el rendimiento porcentual por lo que no podemos precisar este parámetro; sin embargo, Buitrago *et al.* (2015) extrajo aceite esencial de hojas y frutos de *V. macrophylla* por hidrodestilación y determinó un rendimiento de 1,3 % en hojas y en frutos 5,6 %.

Caracterización de componentes terpenoidales de la resina de *Vismia macrophylla*

La Figura 2 muestra del extracto obtenido del látex de *V. macrophylla* con CO₂ supercrítico un perfil cromatográfico representativo de 13 componentes; siendo su abundancia de mayor a menor: Terpinen-4-ol (36,08 %), α-Terpineol (21,46 %), α-Eudesmol (16,89 %) y α-Copaene (8,90 %) y Alcanfor (3,99%); el resto de los

componentes se encuentran por debajo del 3 % (Tabla 1). De los 13 componentes identificados 6 son monoterpenos, 6 sesquiterpenos y un hidrocarburo bicíclico. Además, son de estructura monocíclica, bicíclico y tricíclico, los tiempos de retención de los componentes identificados fluctúan desde 8,789 minutos para el α -Pino hasta 27,448 minutos para el α -eudesmol.

El estudio realizado por Silvestre (2012) de *Vismia guianensis* recolectado en Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco (Brasil), utilizando el método convencional de extracción con metanol, encontró la presencia de terpenos; que concuerdan con el estudio del látex de *V. macrophylla* recolectada en la zona de Nina Rumi y extraído con fluido supercrítico. Martines *et al.* (2014) de *Salvia officinalis* L., extrajo componentes volátiles y semivolátiles por fluidos supercríticos, la presencia de terpenos es similar al presente estudio, pero varía en cuanto a la composición porcentual en cada especie estudiada, esto podría estar influenciado por la variación del hábitat y por corresponder a especies distintas. *Vismia macrophylla* tiene mayor cantidad de α -pino, β -pino, alcanfor, α -cadineno que *Salvia officinalis* L.

En el presente trabajo encontramos terpenos en el extracto del látex con CO₂ supercrítico de *V. macrophylla*, mientras que Buitrago *et al.* (2016) no encontró terpenos en las hojas de esta misma especie en Táchira (Venezuela); pero en las hojas y frutos si encontraron sesquiterpenos monocíclicos, sesquiterpenos cíclicos, cíclicos oxigenados (Buitrago *et al.*, 2015). Estos resultados podrían sugerir que probablemente la presencia de los terpenos varía en los órganos de la misma especie; a la vez que podría estar relacionado con la distribución de la especie, hábitat, suelo, edad, genética etc.

Los resultados obtenidos para *V. macrophylla* reportan trece compuestos químicos, con una alta cantidad de α -eudesmol (16,89 %), cantidad muy superior a la encontrada en *Lepechinia vulcanicola* (Rosero, 2013); por lo que, sería una fuente natural importante de α -eudesmol para fines medicinales. De acuerdo a Juárez *et al.* (2010), *Citrus sinensis* tiene tres componentes químicos, los cuales son limoneno, β -linalol, decanal y 8(10)-pino, (1s,5s)-(-)-, cantidad ampliamente superada por *V. macrophylla*, a excepción del limoneno que se encuentra en menor cantidad. Esta diferencia en la cantidad puede ser explicado a que el limoneno es un

Tabla 1. Componentes terpenoidales del extracto de la Resina de *Vismia macrophylla* procedente de Nina Rumi, Loreto, Perú.

Nº	Componente	Abundancia de cada componente (%)
1	α -Pino	1,35
2	β -Pino	1,65
3	Limoneno	1,39
4	Terpinoleno	1,16
5	Alcanfor	3,99
6	Terpinen-4-ol	36,08
7	α -Terpineol	21,46
8	α -Copaene	8,90
9	β -Curcumeno	1,29
10	α -Curcumeno	2,22
11	δ -cadinene	2,03
12	α -Acorenol	1,59
13	α -Eudesmol	16,89

componente principal de los cítricos que pertenecen al género *Citrus*, mientras que, en plantas pertenecientes a otros géneros y especie como *Vismia* el limoneno no es componente principal.

Los monoterpenos y los sesquiterpenos son componentes presentes en los aceites esenciales, se usa en varias líneas industriales: perfumería, cosmética, alimentaria y farmacéutica. El extracto de la resina de *V. macrophylla* por fluido supercrítico CO₂ por contener componentes mayoritarios con propiedades farmacológicas ya reportadas, tal es el caso de Terpinen-4-ol, α -Terpineol, α -Eudesmol y α -Copaene como antifúngicas, antioxidantes, citotóxicos, antiinflamatorios y antibacterianas (An et al., 2018), por lo que la obtención de estos compuestos se orienta a un uso farmacológico. La segunda parte de la presente investigación estaría direccionada a pruebas biológicas in vitro para determinar la actividad antibacterial sobre cepas de bacterias que causan daños dermatológicos.

CONCLUSIÓN

El método de extracción por fluidos supercríticos con CO₂ bajo condiciones establecidas de extracción de temperatura 40 °C, presión 3200 PSI, separó los componentes volátiles de la resina de *V. macrophylla* que luego sometidos al análisis cromatográfico se identificó monoterpenos y sesquiterpenos. Los componentes terpenicos presentes le dan la característica resinosa al látex de *V. macrophylla*.

Se identificaron 13 componentes, los principales son Terpinen-4-ol (36,08 %), α -Terpineol (21,46 %), α -Eudesmol (16,89 %) y α -Copaene (8,89 %). Dado el alto porcentaje de compuestos con características farmacológicas, *V. macrophylla* puede ser una fuente natural de compuestos bioactivos contra infecciones bacterianas en especial contra enfermedades de la piel, con potencial aplicación en la industria farmacéutica. Quimiotaxonómicamente existe una notoria variación intraespecífica entre los componentes químicos existentes en *V. macrophylla* dependiendo de su hábitat.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana y al Grupo de Investigación de Ingeniería en Bioprocesos y Biomateriales del Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, E., et al. (2008) Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *VITAE, revista de la facultad de química farmacéutica*, 15 (1): 165-172.
- An, P., Yang, X., Yu, J., Qi, J., Ren, X., Kong, Q. (2018) α -terpineol and terpene-4-ol, the critical components of tea tree oil, exert antifungal activities in vitro and in vivo against *Aspergillus niger* in grapes by inducing morphous damage and metabolic changes of fungus. *Food Control*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.013>
- Buitrago, D., Rojas, J. Peñaloza, Y. (2016) In vitro antioxidant activity and qualitative phyto-chemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in Los Andes, Venezuela, *Revista de Biología Tropical*, 64 (4): 1431-1439.
- Buitrago, A., et al. (2015) Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Vismia macrophylla* Leaves and Fruits Collected in Táchira-Venezuela, *Natural Product Communications*, 10 (2): 233 -378
- Hussain, H., et al. (2012) Chemistry and biology of genus *Vismia*, *Pharmaceutical Biology*, 50:11, 1448-1462, DOI: 10.3109/13880209.2012.680972
- Juárez, et al. (2010) Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de *Citrus sinensis* L (Naranja dulce) y formu-

- lación de una forma farmacéutica. *Ciencia e Investigación* 13(1): 9-13
- Kemegne, et al. (2017) Antimicrobial structure activity relationship of five anthraquinones of emodine type isolated from *Vismia laurentii*. *BMC Microbiology*, 17 (41): 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0954-1>
- Lack, E., Simándi, B. (2001) *Supercritical Fluid Extraction and Fractionation from Solid Materials*. *Industrial Chemistry Library*, 537–575. doi:10.1016/s0926-9614(01)80032-0
- Magalhaes, et al. (2021) Combining chemometric and phytochemical tools to isolate and characterize activity of *Vismia gracilis* compounds against *Aedes aegypti*. Short Communication, *Natural Product Research*. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1912747>
- Martínez, J., et al. (2014) Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO₂ supercrítico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias exactas*. 38 (148): 237-49
- Oliveira, et al. (2017) Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 195: 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.030>
- Poletto, D. (2021) *Hypericeae e Vismieae: desvendando aspectos químicos e etnobotânicos de taxons de Hypericaceae* (Tesis postgrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul de Brasil
- Policegoudra, R. et al. (2012) Bioactive constituents of Homalomena aromatica essential oil and its antifungal activity against dermatophytes and yeasts. SHORT COMMUNICATION. *Journal de Mycologie Médicale* 22: 83-87
- Rojas, J., et al. (2020) Essential oil composition and cytotoxic activity in two species of the plant genus *Vismia* (Hypericaceae) from the Venezuelan Andes. *Revista de Biología Tropical*, 68(3): 884-891.
- Rosero, A. (2013) *Caracterización de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de hojas y tallo de la planta salvelugo del Galeras Lepechinia vulcanicola por medio de CG-EM* (Tesis). Universidad de Nariño San Juan de Pasto de Colombia
- Silvestre, R., et al. (2012) "Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits", *African Journal of Biotechnology*. 11 (41): 9888-9893
- Trepiana, J., Ruiz, B., Ruiz J. (2018) Unraveling the in vitro antitumor activity of *Vismia baccifera* against HepG2: role of hydrogen peroxide. *Heliyon* 4 (e00675). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00675>
- Uribe, J., et al. (2011) Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56(2), 174–178. doi:10.1016/j.supflu.2010.12.007
- Vizcaya, M., et al. (2014) composición química y evaluación actividad antifúngica del aceite esencial de la corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 34: 86-90.
- Vizcaya, M., et al. (2012) Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas* 11(1): 12 - 34. www.blacpma.usach.cl

Conflicto de Interés

Los autores declaramos no tener ningún conflicto de interés, estando de acuerdo con el orden de los autores y con el contenido de todo el manuscrito del artículo científico.

