

Artículo original

Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

Phytochemical screening and antibacterial activity of the extract of the leaves of *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

Aparicio-Zambrano Rosa^{1*}, Cortez-Pérez María², Obregón-Díaz Ysbelia¹, Pérez-Colmenares Alida¹, Cordero Yndra³, Salazar-Vivas José¹, †Rojas-Fermín Luis¹, Villasmil Thayded⁴, Usubillaga Alfredo¹.

¹Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101 Venezuela. ²Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, Venezuela. ³Departamento de Bioanálisis Clínico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, Venezuela. ⁴Departamento de Farmacia Galénica, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, CP 5101, Venezuela.

Recibido: abril de 2024–Aceptado: junio de 2024

RESUMEN

Espeletiopsis pannosa (Standl.) Cuatrec., conocida como frailejón plateado, fue recolectada en los alrededores de la Laguna de Mucubají, ubicada en el Parque Sierra Nevada del estado Mérida, Venezuela. Las hojas secas y molidas se extrajeron con hexano/éter (3:1) en Soxhlet a 50°C. Los metabolitos secundarios fueron determinados mediante pruebas químicas de coloración y/o precipitación. La actividad antibacteriana se evaluó a una concentración de 1000 ppm frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) por el método de difusión de agar con discos. Los resultados del tamizaje fitoquímico permitieron demostrar la presencia de diterpenos, triterpenos y esteroides. El extracto presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* con halos de inhibición de 7 mm para cada bacteria,

mientras que *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* fueron resistentes. Este es el primer estudio sobre el tamizaje fitoquímico y la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

PALABRAS CLAVE

Asteraceae, *Espeletiopsis*, *Espeletiopsis pannosa*, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Espeletiopsis pannosa (Standl.) Cuatrec., known as silver frailejón was collected in the surroundings of Mucubají Lagoon, located in moors Páramo Sierra Nevada (Mérida, Venezuela). The dried and ground leaves extracted in a Soxhlet at 50°C. Secondary metabolites were determined by chemical staining and/or precipitation tests. The antibacterial activity was evaluated at a concentration of 1000 ppm against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis*

(ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) by the agar disc diffusion method. Results obtained from this phytochemistry screening showed the presence of diterpenos, sterols and triterpenes. The extract presented antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with inhibition zones of 7 mm for each bacteria, while *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* were resistant. This is the first phytochemical screening and antibacterial activity performed on the leaves of *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

KEY WORDS

Asteraceae, *Espeletiopsis*, *Espeletiopsis pannosa*, phytochemistry screening, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

La familia Asteraceae (Compositae), está ubicada dentro del orden Asterales, constituye un grupo cosmopolita, del que se reportan entre 1500 géneros y 25000 especies [1]. Los frailejones, son plantas que crecen en los páramos andinos de Colombia, Venezuela y Norte de Ecuador [2]. Cuatrecasas, botánico español radicado en Colombia se dedicó al estudio de estas plantas y en base al conocimiento que poseía de todas las especies estudiadas, consideró que todas tenían una morfología muy especial y llegó a la conclusión de que debían estar en una unidad taxonómica superior y las agrupó en la Subtribu Espeletiinae, se encuentra dividida en ocho géneros, según las características anatómicas, tres géneros arbóreos: *Carramboa*, *Libanothamus* y *Tamania*, y cinco géneros herbáceos: *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Paramiflos* y *Ruilopezia* [3]. El género *Espeletiopsis* contiene 25 especies distribuidas en Colombia y Venezuela [4]. Las especies *E. angustifolia*, *E. cristalinensis*, *E. meridensis*, *E. pannosa*, *E. pozoensis* y *E. purpurancens* son endémicas de los estados Mérida, Táchira y Trujillo (Venezuela) [5, 6].

Espeletiopsis pannosa (Standl.) Cuatrec., es conocida como frailejón plateado [7], las hojas y partes aéreas han sido usadas en la medicina tradicional para tratar enfermedades respiratorias (bronquitis, asma), artritis, otitis, sudorífico y enfermedades de la piel [8]. Un estudio previo realizado por Usubillaga y cols (2003), indica que la fracción ácida del extracto hexano-éter de las hojas de esta planta contiene compuestos de origen diterpénico [9]. En la presente investigación se presenta el análisis fitoquímico preliminar y la actividad antibacteriana de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Botánico: La planta fue recolectada por el Dr. Alfredo Usubillaga, en los alrededores de la Laguna de Mucubaji, ubicada en el Parque Sierra Nevada del estado Mérida, Venezuela en enero de 1999. Una muestra testigo fue depositada e identificada como *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., por el Dr. Pablo Meléndez en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Voucher AU13).

Obtención del Extracto: Las hojas frescas (3,0 Kg) de la planta se separaron y colocaron en bandejas en una estufa a 40°C hasta completa sequedad, luego se procedió a moler para la obtención de un polvo fino. Posteriormente, se pesó 450,0 g del material vegetal molido y se realizó una extracción en Soxhlet con una mezcla de hexano-éter (3:1) (500 mL). La solución obtenida se filtró y concentró en un rotavapor a presión reducida a una temperatura no mayor a 45°C hasta un tercio de su volumen y se guardó en un frasco color ámbar a 4°C.

Tamizaje fitoquímico: La caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de hexano-éter de las hojas de *E. pannosa* (Standl.) Cuatrec., (14,72 g), se efectuó mediante una serie de pruebas químicas cualitativas de coloración y/o precipitación descritas por Marcano y Hasegawa, (2002) [10].

Actividad antibacteriana: Las cepas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29219), *Klebsiella*

pneumoniae (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y las proporcionó el Cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo al método de difusión en agar con disco, el ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo en 2,5 mL de caldo Müeller-Hinton a 37°C. El inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL) [11]. Cada inóculo se diseminó sobre la superficie de una placa que contenía agar Müeller-Hinton y luego se colocaron los discos (6 mm de diámetro) previamente impregnados con 10 µL del extracto, el control negativo (dimetilsulfóxido) y el disco estándar del antibiótico de referencia (Piperacilina® 100 µg; Ampicilina® 10 µg; Eritromicina® 15 µg) como control positivo para cada uno de los microorganismos.

El medio de cultivo inoculado se sometió a preincubación durante 30 minutos, posteriormente se incubaron las placas por 24 horas a temperatura de 37°C y se realizó la lectura de los halos alrededor del disco. Se consideró como resultado positivo cuando un halo de inhibición de crecimiento se observó alrededor del disco. En el caso contrario, la ausencia de halo se interpretó como resultado negativo o resistente. El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antibacteriana de las muestras se expresó en milímetros (mm) [12].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* tuvo un rendimiento de 3,27 %, las características físicas se presentan en la Tabla 1. En referencia al tamizaje fitoquímico (Tabla 2), se evidencia que los resultados permitieron establecer la presencia de esteroides, diterpenos y triterpenos, así como la ausencia de alcaloides, saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, quinonas, lactonas y cumarinas. Esta información se correlaciona con lo reportado por Usubillaga y cols., en el 2003, que identificaron a través de cromatografía de gases-masas (CG/EM) diversos diterpenos como el ácido kaurénico, ácido

gradiflorénico, ácido 15 α -hidroxi-kaurénico, y ácido 15 α -isovaleroxi-kaurénico en la fracción ácida del extracto hexano:éter (3:1) de las hojas de *E. pannosa* [9]. Adicionalmente, para especies de la subtribu Espeletiinae diversos investigadores han reportado la presencia de diterpenos y triterpenos [13-15], estos compuestos poseen diversas propiedades farmacológicas como anti-inflamatoria, antipirética, antibacteriana, citotóxica, antialimentaria y antiparasitaria [16-20].

TABLA 1

Características físicas del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

Características	Extracto hexano-éter (hojas)
Aspecto	Viscoso
Color	Verde
Olor	Característico
Peso del material seco	450 g
Peso del extracto	14,72 g
Rendimiento	3,27 %

TABLA 2

Tamizaje fitoquímico del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

Metabolitos	Pruebas	Resultados Extracto hexano-éter (Hojas)
Alcaloides	Mayer	-
	Dragendorff	-
	Wagner	-
Esteroides	Liebermann-Burchard	+++ (verde)
Triterpenos		++ (rojo)
Saponinas	Espuma	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃ 1 %	-
Taninos	Gelatina 1 %	-
Flavonoides	Shinoda	-
Quinonas y/o Antraquinonas	NH ₄ OH conc.	-
	H ₂ SO ₄ conc.	-
Cumarinas	NH ₄ OH conc.	-
Lactonas sesquiterpénicas	NaOH al 10 %	-
Glicósidos cardiotónicos	Keller-Kiliani	-
Diterpenos	Acetato de cobre	+ verde fugaz

Leyenda: - (ausente); + (escaso); +++ (abundante).

La actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de la especie *Espeletiopsis pannosa* (Tabla 3) fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar con disco frente a bacterias ATCC grampositivas y gramnegativas, en una

concentración de 1000 ppm. Los ensayos realizados indicaron que el extracto fue activo frente a *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* con halos de inhibición de 7 mm para cada bacteria, mientras que *E. faecalis* y *P. aeruginosa* fueron resistentes. Estudios previos sobre la actividad antibacteriana del género *Espeletiopsis* señalan que

los aceites esenciales de las hojas de *E. angustifolia* y *E. pozoensis* fueron activos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, [21,22], sin embargo, este es el primer reporte de actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *E. pannosa*.

TABLA 3

Actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.

Microorganismos	Halos de Inhibición (mm*)			
	Extracto EHHE (1000 ppm)	Antibióticos		
		Pip	Amp	Eri
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	7*	-	-	23*
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0	-	17*	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	7*	21*	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	7*	21*	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	21*	-	-

Leyenda: EHHE: extracto de hojas hexano-éter, Pip: Piperacilina® 100 µg; Amp: Ampicilina® 100 µg; Eri: Eritromicina® 15 µg; ppm: partes por millón; mm*: milímetros de los halos de inhibición.

CONCLUSIONES

El análisis fitoquímico preliminar del extracto hexano-éter de las hojas de la *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec., permitió identificar cualitativamente la presencia de compuestos de origen terpénico (diterpenos, triterpenos y esteroides). En la actividad antibacteriana presentaron sensibilidad las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a una concentración del extracto de 1000 ppm. Este es el primer estudio de la composición química y actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* Cuatrec, lo cual representa un aporte para la fitoquímica del género *Espeletiopsis* que incentiva futuras investigaciones sobre esta especie endémica de Los Andes venezolanos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al personal del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia

y Bioanálisis, así como al Laboratorio de Actinomicetos del Instituto, al herbario MERF “Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, y al Ceparió del Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.P.G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linn. Soc. 2003; 141: 399-436.
- [2] Padilla F, Díazgranados M, Oliveira T, Branquinho T, Chagas D, Da Costa F. Chemistry of the subtribe Espeletiinae (Asteraceae) and its correlation with phylogenetic data: an in silico chemosystematic approach. Bot. J. Linn. Soc. 2017; XX: 1–29. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box078/4762254>
- [3] Cuatrecasas J. A new sub-tribe in the Heliantheae (Compositae): Espeletiinae

- . Phytologia. 1976; 35(1): 43-61.
- [4] Díaz S, Rodríguez B. Nuevas Especies Colombianas de *Espeletiopsis* Cuatrec. y de *Espeletia* Mutis ex Humb. & Bonpl. (Asteraceae, Heliantheae, Espeletiinae). Rev. Acad. Colomb. Ci. Exact. 2010; 34(133): 441-454.
- [5] Cuatrecasas J. Clave provisional de las especies del Género *Espeletiopsis* Cuatrec. (Espeletiinae, Compositae). Anales Jard. Bot. 1996; 54(1): 370-377.
- [6] Badillo M. Lista actualizada de las especies de la familia Compuestas (Asteraceae) de Venezuela. Ernstia. 2001; 11: 147-215.
- [7] Aristeguieta L. Compositae. Flora de Venezuela. 1964; 10(1): 43-61.
- [8] Hidalgo D, Ricardi M, Gaviria J, Estrada J. Contribución a la Etnofarmacología de los Páramos Venezolanos. Ciencia. 1999; 7(1): 23-32
- [9] Usubillaga A, Romero M, Aparicio R. Kaurenic Acid In Espeletiinae. Acta Hort. 2003; 597: 129-130.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.597.17>
- [10] Marcano D, y Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Consejo Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela: Venezuela. 2002.
- [11] Narváez S, Gómez M, Martínez M. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislados a partir de sedimentos del Caribe colombiano. Bol. Investig. Mar. Costeras-Inveemar. 2008; 37(1): 63-77.
- [12] Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th. 2020. [Página Web] 2020 [acceso: 5 de noviembre de 2020]. Disponible en: https://www.clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf.
- [13] Usubillaga A. Etnobotánica de los frailejones: aspectos químicos y medicinales. En Naranjo P. Etnomedicina y Etnobotánica, avances en la Investigación. Edición Abya-Yala. Universidad Andina Simón Bolívar, Quito Ecuador. 2010. p 109-156.
- [14] Meccia G, Quintero P, Rojas L, Usubillaga A, Carmona J. Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de los Andes venezolanos. Av. Qui. 2010; 5(1): 45-49. www.saber.ula.ve/avancesenquimica.
- [15] Pinto E, Torres K. Estudio Fitoquímico y Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de la *Coespeletia timotensis* Cuatrec. (Trabajo Pregrado). Mérida Venezuela. Universidad de Los Andes. 2013.
- [16] Ghisalberti E. The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. Fitoterapia. 1997; 68(1): 303-325.
- [17] Baptista J, Monsalve M, Alonso M, Ávila J, Usubillaga A. Ensayos de actividad antialimentaria sobre *Tribolium castaneum* y *Sitophilus oryzae* de algunos derivados del *ent*-kaureno. Ciencia. 2007; 15(2): 248-258.
- [18] Hueso-Falcón I, Cuadrado I, Cidre F, Amaro J, Ravelo A, Estévez A, de las Heras B, Hortelano S. Synthesis and anti-inflammatory activity of the *ent*-kaurene derivatives. Eur. J. Med. Chem. 2011; 46: 1291-1305. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.052>.
- [19] Cordero de Rojas Y, Ustáriz L, Araujo L, Usubillaga A, Rojas F, Moujir L. Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. Rev. Fac. Farm. 2017; 59(2): 03-07.
- [20] Cordero Y, Lucena M, Araujo L, Usubillaga A, †Rojas L, Aparicio R, Laila-Moujir L, Ustáriz F. Efecto citotóxico de diterpenos derivados del ácido *ent*-kaureno aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. Blacpma. 2022; 21(3): 404-417. <https://doi.org/10.37360/blacpma.22.21.3.24>.
- [21] Meccia G, Rojas L, Velasco J, Díaz T, Usubillaga A. Composition and antibacterial Screening of the Essential Oils of Leaves and Roots of *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. Nat. Prod. Comm. 2007; 2: 1221-1224.
- [22] Aparicio R, Rojas L, Velasco J, Vega C, Usubillaga A. Caracterización química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Espeletiopsis pozoensis* Cuatrec. (Cuatrec). Rev. Latinoamer. Quím. 2021; 48(1-

3): 7-14.

[23] Villa N, Lozoya E, Pacheco Y. Kaurenoid acid: a diterpene with a wide range of biological activities. *Stud. in Nat. Prod. Chem.* 2016; 51: 151-174.

Rosa Lizbeth Aparicio Zambrano: Dra. En Química Aplicada. MSc. En Química de Medicamentos, Farmacéutico. Investigador en Ciencias Básicas, Naturales y Aplicadas, adscrita al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” Correo: apariciorosa12@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-5020-0954>.

María Celena Cortez Pérez: Licenciada en Bioanálisis. Correo: celenacortez25@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0009-0000-6775-5983>.

Ysbelia Miyeli Obregón Díaz: Dra. En Química de Medicamentos. Farmacéutico. Profesora Agregado adscrita al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” Correo: ysbeliaobregon@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0001-6152-6696>.

Pérez Colmenares Alida Alejandra Dra. En Química Aplicada. MSc. En Química de Medicamentos, Farmacéutico. Profesora Asociado adscrita al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” alidaperezc@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0001-8910-4663>.

Yndra Elena Cordero: Dra. En Ciencias Aplicadas. MSc. En Biología y Salud. Farmacéutico. Profesora Titular adscrita al Departamento de Bioanálisis Clínico yndracpdero@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0001-7015-2796>.

José Emilio Salazar Vivas: Técnico Medio en Mecánica de Producción. Auxiliar del Laboratorio adscrito al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0001-8077-7386>

Villasmil Thayded Oleida: Dra. En Química Aplicada. Farmacéutico. Profesor Asistente adscrita al departamento de Farmacia Galénica. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0009-0006-8563-2067>.

†**Luis Beltrán Rojas Fermín:** Dr. En Química Orgánica. MSc. En Química de Medicamentos. Farmacéutico. Profesor Titular adscrito al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0003-4508-1927>.

Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro: Dr. En Química. Ing. Químico. Profesor Titular Jubilado adscrito al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”. Correo: usubi80@gmail.com. **Orcid ID:** <https://orcid.org/0000-0002-2913-5684>.