

ESTUDIO COMPARATIVO POR GC-MS DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE DOS QUIMIOTIPOS DE *Lippia organoides* H.B.K., OBTENIDOS POR DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN

RESUMEN

Se analizaron extractos de hojas de dos quimiotipos de *Lippia organoides*., cultivados en el Complejo Agroindustrial de CENIVAM (UIS). Se utilizaron las técnicas de extracción: hidrodestilación asistida por radiación de micro-ondas, extracción con solvente - destilación simultánea y extracción con fluido supercrítico. Los metabolitos secundarios fueron separados por cromatografía capilar con detección de masas. La identificación se llevó a cabo por comparación de espectros de masas con bases de datos, patrones e índices de Kováts. Los compuestos mayoritarios en los extractos para el quimiotipo I fueron: *p*-cimeno (13%), y 1,8-cineol (9%). Para el quimiotipo II: timol (56%), y *p*-cimeno (10%).

PALABRAS CLAVES: *Lippia organoides*, quimiotipos, aceite esencial, extractos.

ABSTRACT

Microwave-assisted hydrodistillation, simultaneous distillation-solvent extraction, and supercritical fluid extraction, were used to isolate secondary metabolites from two Lippia organoides chemotypes cultivated in an experimental garden. Compound identification was based on chromatographic and mass-spectral criteria. The main components identified in the chemotype I extracts were p-cymene (13%) and 1,8-cineole (9%). The main components found in the chemotype II extracts were thymol (56%) and p-cymene (10%).

KEYWORDS: *Lippia organoides*, chemotypes, essential oil, extracts.

CARLOS RUIZ

Estudiante de Química
Universidad Industrial de
Santander

FABIÁN TUNAROSA

Estudiante de Química
Universidad Industrial de
Santander

JAIRO MARTÍNEZ

Químico, Ph.D.
Profesor Titular,
Escuela de Química
Universidad Industrial de
Santander

ELENA STASHENKO

Química, Ph.D.
Directora CENIVAM.
Directora Lab. de Cromatografía
Escuela de Química
Universidad Industrial de
Santander
elena@tucan.uis.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

El género *Lippia* se caracteriza por reunir especies a las que se les atribuyen cualidades aromáticas. Algunas plantas del género han sido ampliamente estudiadas en relación con la composición química de sus aceites esenciales (e.g: *Lippia alba*, *Lippia multiflora*) [1,2]. Los estudios de plantas en el área de los productos naturales, aspiran establecer relaciones entre la composición química de sus metabolitos secundarios y propiedades farmacológicas. Además, el conocimiento de las propiedades químicas de los aceites esenciales y otros extractos, permite proponer a estos productos como fuente alternativa y natural, de compuestos útiles en la industria y tecnología (cosmética, alimentos, fragancias, síntesis química). Sin embargo, aún hay plantas dentro de este género que no han sido lo suficientemente estudiadas para ser incluidas, por su utilidad, en este campo de aplicación. Es el caso de *Lippia organoides* H.B.K., un arbusto silvestre en el nordeste de Suramérica y algunos países de Centroamérica y las Antillas [3]. *Lippia organoides* H.B.K. alcanza 3 m de longitud, posee hojas verdes ovadas muy aromáticas e inflorescencias en racimo, axilares y blancas. En Colombia suele encontrarse en los departamentos de Guajira, Magdalena,

Cauca, Cundinamarca, Norte de Santander y Santander. En este último, *Lippia organoides* H.B.K. se encuentra a altitudes entre 500-800 m.s.n.m., formando asociaciones vegetales con otras especies características de la región (*Lantana canescens*, *Senna palida*, *Opuntia depauperata*. entre otras) [4,5]. Generalmente se le conoce como "orégano" y junto con las especies que son nombradas del mismo modo, presentan como compuestos mayoritarios en su aceite esencial timol y carvacrol. Las infusiones de flores y hojas de esta planta, son consumidas para tratar afecciones respiratorias e intestinales [4,6].

Variaciones en la composición química de metabolitos secundarios en plantas de la misma especie, ha conducido a designar quimiotipos (*chemotypes*). Por ejemplo, estudios de la composición de aceites esenciales de *Lippia junelliana*, *Lippia javanica* y *Lippia glandulosa* en individuos de la misma especie y región geográfica, manifiestan variaciones que permiten agruparlos de acuerdo con la presencia de ciertos compuestos mayoritarios en el aceite esencial [7,8]. De igual modo, se han observado cambios drásticos en la composición química del aceite esencial de *Lippia organoides* H.B.K., especie recolectada en la cuenca oriental del

cañón del Chicamocha, con respecto a la composición reportada en literatura; donde el porcentaje de carvacrol varía significativamente encontrándose como compuesto mayoritario [6,9]. La composición de los extractos está sujeta a variables tales como: técnica de extracción, tratamiento o almacenamiento del material vegetal y condiciones geobotánicas de crecimiento [1]. Sin embargo, al mantener todas estas variables constantes entre las plantas comparadas, se han advertido diferencias persistentes en la naturaleza química de los metabolitos secundarios. Estos resultados permiten apuntar a variaciones genéticas en la especie. Las diferencias químicas pero no morfológicas de *Lippia organoides* H.B.K. son la base de este trabajo que busca estudiar comparativamente la composición química de extractos de dos quimiotipos. Los resultados permitirán, además de sugerir un modo de caracterización de quimiotipos, conocer más sobre las posibles utilidades o beneficios que puedan aportar a la naciente agroindustria de los aceites esenciales, proyecto traducido en los trabajos e investigaciones que efectúa actualmente CENIVAM.

2. CONTENIDO

2.1 Material vegetal

Los quimiotipos de *Lippia organoides* H.B.K. se sembraron por medio de esquejes provenientes de los alrededores de Jordán Sube (Santander, Colombia) en la cuenca del cañón del río Chicamocha. Los quimiotipos se encontraron en asociación vegetal, diferenciados por el olor que despedían sus hojas al ser estrujadas. En el complejo agroindustrial de CENIVAM, ubicado en el campus de la Universidad Industrial de Santander, las plantas se sembraron en sentido norte-sur, espaciadas a 40 cm entre plantas y 90 cm entre camas de siembra. Se procuró que el sitio de crecimiento de las plantas se mantuviera a luminosidad solar completa. Para el muestreo, las hojas frescas se recolectaban en horas de la mañana (7-8 a.m.) escogiendo solo hojas sin daños. Durante el estudio, las plantas se hallaban en floración con 5 meses de ser sembradas a espacio abierto. Los pliegos testigo de cada planta fueron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL) de la siguiente manera: *Lippia organoides* H.B.K., quimiotipo “timol” (N°COL 512075); *Lippia organoides* H.B.K., quimiotipo “p-cimeno” (N°COL 512270)

2.2 Materiales y reactivos

Sulfato de sodio y diclorometano se compraron a *Aldrich Chemical Co.* Inc. (Milwaukee, WI, EE.UU). Gases especiales para cromatografía se compraron a *AGA-Fano S.A.* (Bucaramanga, Colombia)

2.3 Extracciones

Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHd) se llevó a cabo usando un montaje tipo Clevenger, calentado con un horno microondas (LG Intelowave, 2450 MHz, 720 W).

Destilación con vapor-extracción con solvente (SDE), se realizó utilizando un equipo a micro-escala para solventes de alta densidad, empleado diclorometano como solvente de extracción. Así, se obtuvo un extracto que fue concentrado con una corriente de N₂, y deshidratado con Na₂SO₄ anhidro [1].

Extracción con fluido supercrítico (SFE), se llevó a cabo empleando extractores Soxhlet de alta presión (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) y CO₂ como solvente. El extracto se disolvió en diclorometano, se concentró y deshidrató de la misma manera como el extracto de SDE.

2.4 Análisis cromatográfico

La identificación de los componentes presentes en los AEs y extractos de *Lippia organoides* se llevó a cabo por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), empleando un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890 Plus* (HP, Palo Alto, California, USA) acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5975* equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (1:50), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos HP-MS *ChemStation G17001DA* (Versión D.00.01.27, 2002), incluyendo las bases de datos ADAMS 2004, NIST 2002, y WILEY 138K. Se utilizó una columna capilar apolar de sílice fundida DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 µm, d_f con fase estacionaria de 5% fenil – poli(metil siloxano) y una columna polar de sílice fundida DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 µm, d_f con fase estacionaria de poli(etilenglicol). La temperatura del horno se programó desde 45°C, (5 minutos) hasta 150°C (2 minutos) a razón 4°C/min, luego se incrementó hasta 250°C (5 minutos) a razón de 5°C/min. Finalmente, la temperatura aumentó a razón de 10°C/min hasta alcanzar 275°C (15 minutos). Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia se mantuvieron a 230 y 285 °C, respectivamente.

2.5. Resultados y discusión

El análisis cromatográfico de los extractos, permite observar cambios pronunciados en la naturaleza química de los metabolitos secundarios de los dos quimiotipos de *Lippia organoides* H.B.K. Los resultados se muestran a continuación en las tablas 1 y 2.

Compuesto	I _K		Cantidad relativa / %		
	DB-5MS	DB-WAX	MWHD	SDE	SFE
α -Tuyeno	-	1164	5,4	6,7	5,8
α -Pino	-	1020	1,9	2	0,56
α -Felandreno	1015	1165	4,4	5,9	5,8
<i>p</i> -Cimeno	1038	1270	16,0	12,7	11,2
Limoneno	1043	1197	4,8	4,6	3,7
β -Felandreno	-	1207	7,7	7,6	3,6
1,8-Cineol	1045	1210	7,2	7,8	10,8
1-Terpinen-4-ol	1190	1607	2,3	2,7	tr
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1439	1610	6,4	7,2	15,9
α -Humuleno	1474	1685	4,0	4,5	7,5
γ -Muuroleño	1477	1699	1,6	1,9	2,4
Óxido de <i>trans</i> - β -Cariofileno	1603	2008	3,4	2,5	2,5
Humuleno epóxido II	1630	2064	1,1	0,82	0,97
β -Eudesmol+ α -Eudesmol	1679	2239/2249	6,4	5,6	7,2
Fitol	2100	2719	0,4	tr	2,7

Tabla 1. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles, aislados de *Lippia origanoides* H.B.K. (Quimiotipo I) por hidrodestilación asistida por la radiación de micro-ondas, extracción con solvente - destilación simultánea y extracción con fluido supercrítico.

tr: trazas

Compuesto	I _K		Cantidad relativa / %		
	DB-5MS	DB-WAX	MWHD	SDE	SFE
α -Pino	-	1018	0,3	0,6	tr
α -Felandreno	1011	1023	1,0	1,8	0,2
ρ -Cimeno	1032	1270	11,8	14,7	4,6
Limoneno	1036	1195	0,4	0,7	0,1
β -Felandreno	1038	1163	3,5	5,1	1,0
γ -Terpineno	1066	1246	7,3	8,9	2,6
Hidrato de Sabineno	1077	1466	0,7	0,8	0,5
1-Terpinen-4-ol	1188	1609	0,7	0,8	0,5
Eter metílico de timilo	1232	1593	2,1	3,5	1,4
Timol	1305	2182	56,3	33,9	77,7
Carvacrol	1328	2212	0,6	0,8	0,4
Acetato de Timol	1354	2199	0,4	0,8	0,1
<i>trans</i> - β -Cariofileno	1438	1609	3,2	4,5	3,5
α -Humuleno	1473	1682	1,8	2,4	2,0
β -Bisaboleno	1516	1733	0,3	0,7	0,3
Óxido de Cariofileno	1601	2021	0,7	0,8	0,4

Tabla 2. Cantidad relativa (%) e identificación de los metabolitos secundarios volátiles, aislados de *Lippia origanoides* H.B.K. (Quimiotipo II) por hidrodestilación asistida por la radiación de micro-ondas, extracción con solvente - destilación simultánea y extracción con fluido supercrítico.

tr: trazas

Los compuestos mayoritarios para el quimiotipo 1 corresponden a monoterpenos (C₁₀H₁₄) y sesquiterpenos (C₁₅H₂₄) no oxigenados, tal como se observa en la Tabla 2, donde *p*-cimeno, β -felandreno y *trans*- β -cariofileno son representativos. En este punto es importante resaltar que para la técnica de extracción SFE se obtuvo un porcentaje relativo más alto del sesquiterpeno, *trans*- β -

cariofileno poniendo de manifiesto que esta técnica es importante para obtener las fracciones más pesadas del extracto.

Para el quimiotipo 2, un alto porcentaje del extracto corresponde a timol, un fenilpropano (C₁₀H₁₄O), y ρ -cimeno, monoterpeno no oxigenado. Tal composición, puede explicar las diferencias en el aroma del aceite

esencial de los quimiotipos. Un porcentaje acentuado de timol, le confiere al quimiotipo correspondiente un aroma característico y persistente, mientras que el otro posee un aroma un tanto más suave y amaderado, producto de la mezcla de *p*-cimeno y *trans*- β -cariofileno. Las Figuras 1 y 2 muestran las diferencias encontradas en la composición química de un extracto de los quimiotipos de *Lippia organoides* H.B.K., por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (HRGC/MS).

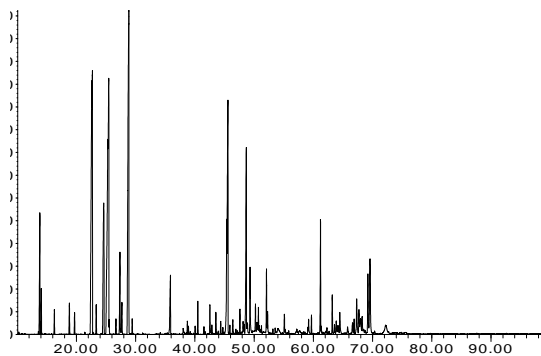


Figura 1. Cromatograma del extracto de SDE de hojas frescas del quimiotipo 1 de *Lippia organoides* H.B.K., fase estacionaria DB-WAX.

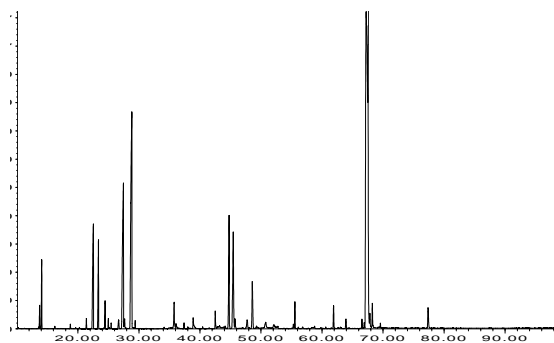


Figura 2. Cromatograma del extracto de SDE de hojas frescas del quimiotipo 2 de *Lippia organoides* H.B.K., fase estacionaria DB-WAX.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las plantas comparadas se sometieron bajo las mismas variables de crecimiento (temperatura, altitud, tipo de suelo, edad, entre otras), tratamiento de material vegetal y modos de extracción. Por lo tanto, se pueden excluir diferencias atribuidas a factores ambientales o de extracción. Las variaciones químicas de los metabolitos secundarios entre las plantas comparadas, podrían ser resultado de variaciones genéticas. Cambios en la biosíntesis se expresan como diferencias en los productos secundarios del metabolismo de plantas de la misma especie.

Se recomienda nombrar los quimiotipos en función de sus componentes mayoritarios. Así, se podrían denominar los quimiotipos 1 y 2 como quimiotipo *p*-

cimeno/eucaliptol y quimiotipo timol/ γ -terpineno, respectivamente.

Se recomienda realizar un estudio de composiciones de extractos que incluya una variedad de edades de la planta pues se podría conocer la composición en diferentes estadios de la especie.

Agradecimientos

A Colciencias-CENIVAM por su apoyo financiero (RC 432 2004). Al doctor José Luis Fernández-Alonso por la identificación botánica de las plantas. A la comunidad de Jordan Sube por su ayuda para encontrar las plantas.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] STASHENKO, E.E., JARAMILLO, B.E. y MARTÍNEZ, J.R. Comparison of Different Extraction Methods for the analysis of Volatile Secondary Metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, Grown in Colombia and Evaluation of its *in vitro* Antioxidant Activity. *J. Chromatogr. A*. 2004. **1025**: 93-103.
- [2] OLADIMEJI, F.A., ORAFIDIYA, L.O., y OKEKE, I.N.. Physical properties and antimicrobial activities of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke. *Int J. Aromatherapy* 2004. **14**(4): 162-168.
- [3] PASCUAL, M.E., SLOWING, K., CARRETERO, E., et al.. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2001. **76**: 73-99
- [4] GARCIA-BARRIGA, H.G. Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica. Tomo II . 2^a ed, Bogota: Tercer Mundo, 1992. p.508.
- [5] ALBESIANO, S., RANGEL-CH, J., y CADENA A.. La vegetación del Cañon del Rio Chicamocha (Santander, Colombia). *Caldasia*, 2003. **25**(1): 74-75.
- [6] OLIVERA D.R., LEITAO, G.C., BIZZO, H.R., et al. Chemical and antimicrobial analysis of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. *Food Chem.* 2007. **101**: 236-240
- [7] JULIANI Jr., H.R., KOROCH, A.R., JULIANI, H.R. et al. Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mol.) tronc. *Biochem System. Ecol.* 2002. **30**:163-170.
- [8] MAIA, J.G., DA SILVA, M.H., ANDRADE, E.H., y CARREIRA L.M.. Essential Oil Variation in *Lippia glandulosa* Schauer. *J. Essent. Oil Res.* 2005. **17**: 676-680.
- [9] DOS SANTOS, F.J., LOPES, J.A., CITO, G.L., et al.. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. *J. Essen. Oil Res.* 2004. **16**:504-506.