

## ESTUDIO DE LA VARIACIÓN CIRCADIANA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES OBTENIDOS POR DESTILACIÓN – EXTRACCIÓN CON SOLVENTE SIMULTÁNEA, DE HOJAS DE *Lippia alba* (Fam. Verbenaceae)

### RESUMEN

Se estudió la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles del extracto de hojas de *Lippia alba*, cultivada en una parcela experimental del Complejo Piloto de CENIVAM, UIS, Bucaramanga. El material vegetal se recolectó a diferentes horas, su extracto se obtuvo por destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) y se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los resultados mostraron que la composición del extracto de *Lippia alba* varía con respecto a la hora de colecta del material vegetal, presentando mayor concentración de la carvona en horas de la noche.

**PALABRAS CLAVES:** *Lippia alba*, Aceite esencial, SDE, GC-MS, ciclo circadiano.

### ABSTRACT

*It was carried out a study of the circadian variation of the volatile secondary metabolites present in the extract from the leaves of Lippia alba that was cultivated in an experimental del complejo piloto of CENIVAM, UIS, Bucaramanga. The vegetal material was collected to different hours, its extract was obtained by simultaneous distillation-extraction and it was analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The results showed that the composition of the extract of Lippia alba varies with respect to the hour of recollection of the vegetal material, displaying greater concentration of the carvone at night times.*

**KEYWORDS:** *Lippia alba*, essential oil, SDE, GC-MS, circadian rhythm.

### SAYDE DUARTE RUEDA

Estudiante de Química  
Universidad Industrial de Santander

### CAROL YORAINÉ CÁRDENAS MELGAREJO

Estudiante de Química  
Universidad Industrial de Santander

### JAIRO MARTÍNEZ MORALES

Químico, Ph. D.  
Profesor Titular, Escuela de Química  
Universidad Industrial de Santander  
rene@tucan.uis.edu.co

### ELENA E. STASHENKO

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

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas crecen en un ambiente complejo, donde el factor de mayor impacto en la producción de metabolitos primarios y secundarios es el clima. La luz es probablemente el factor más importante, se relaciona estrechamente con la temperatura y depende de la estación del año y la hora del día [3]. Dentro de las plantas más estudiadas se encuentran las de la familia *Verbenaceae* (que incluye el género *Lippia*), debido a la marcada variabilidad que presenta la composición de sus aceites esenciales [2, 8]. Esta especie es un subarbolito ampliamente distribuido y de crecimiento espontáneo en América Central. La *Lippia alba*, conocida en Colombia como "Pronto alivio", es una planta aromática en toda su extensión que tiene gran interés etnofarmacológico debido a las propiedades antiespasmódicas, estomacales y antimicrobianas de su aceite esencial [5, 7, 8]. La composición química del AE de *L. alba* depende sensiblemente del origen geográfico de la planta, de las condiciones de cultivo (e.g. deficiencia de nutrientes), la edad, la parte de la planta empleada para la extracción y de otros factores geobotánicos [8]. En este trabajo se estudió la variación cuantitativa de los metabolitos secundarios volátiles de la especie de *Lippia alba*, a lo largo del día.

Fecha de Recepción: 15 Febrero de 2007

Fecha de Aceptación: 12 Marzo de 2007

## 2. CONTENIDO

### 2.1. Materiales y Métodos

#### 2.1.1. Materiales y reactivos

El diclorometano se adquirió en Riedel-de Haën (Alemania) y el *n*-tetradecano, que se usó como patrón interno, *istd*, se compró a *Merck* (Darmstadt, Alemania).

#### 2.1.2. Recolección del material vegetal

Las hojas de *Lippia alba* se recolectaron en un cultivo experimental de CENIVAM. La identificación taxonómica de las plantas se llevó a cabo en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron almacenados de la siguiente manera: *Lippia alba* Mill N.E. Brown ex Britton & Wills. (No COL 512078).

#### 2.1.3. Extracción

Los metabolitos secundarios volátiles de las hojas (10 g) se obtuvieron por destilación-extracción con solvente simultánea (SDE) [4, 6]. Se usó diclorometano como solvente y una duración de extracción de 2 h.

### 2.1.4. Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*; se usó una columna apolar de sílice fundida *DB-5MS* de 60 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ , con fase estacionaria de 5% fenil-poli(metilsiloxano). Se usó un cromatógrafo *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MS 5975* y una columna capilar polar *DB-WAX (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.)*, con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol), de 60 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ . Los índices de retención fueron obtenidos

usando datos de GC de una serie homóloga de hidrocarburos alifáticos saturados entre  $C_{10}$  y  $C_{25}$ , analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. La identificación fue realizada con base en los espectros de masas (EI, 70 eV), índices de Kovats, y por comparación de espectros de masas de patrones y los de las bases de datos (NBS 75K, WILEY 138K, ADAMS 2004 [1] y NIST 2002).

**2.2. Resultados.** En la **Tabla 1** se reportan los metabolitos secundarios volátiles aislados por SDE de cada hora de recolección del material vegetal de *Lippia alba*.

COMPUESTO	$I_k$		Cantidad relativa, %							
	DB-5	DB-WAX	3:00 a.m.	6:00 a.m.	9:00 a.m.	12 m.	3:00 p.m.	6:00 p.m.	9:00 p.m.	12:00 p.m.
Canfeno	954	1064	0.5	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
$\beta$ - Mirceno	991	1164	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.0	1.1
Limoneno	1037	1201	50.6	51.1	43.2	41.8	45.6	38.0	47.6	44.1
<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1048	1253	0.9	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
Linalool	1100	1552	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
Carvona	1257	1747	25.9	27.5	21.1	31.2	29.1	34.3	30.7	31.8
Piperitona	1264	1739	1.5	1.5	1.3	2.1	1.8	2.3	1.9	2.1
Piperitenona	1348	1940	1.6	1.6	1.3	2.5	2.1	2.9	2.2	1.9
$\beta$ -Bourboneno	1395	1527	2.4	1.6	1.8	2.9	3.0	3.1	1.6	2.4
<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno	1455	1670	0.3	0.2	17.9	0.5	0.4	0.6	0.2	0.3
<i>allo</i> -Aromadendreno	1474	1656	0.3	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3
Biciclosesquifelandreno	1495	1624	6.8	5.1	5.4	8.9	8.7	9.8	5.6	6.6

Tabla 1. Identificación y cantidad relativa (%) de los compuestos mayoritarios encontrados en los extractos de *Lippia alba*, a diferentes horas de colecta.

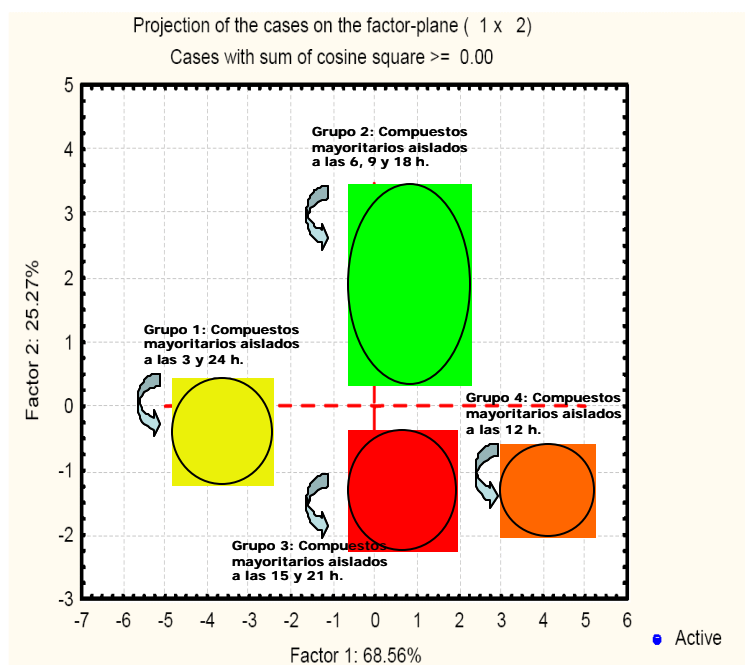


Figura 1. Representación de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles en el extracto de *Lippia*

*alba*, en el espacio formado por los primeros 2 componentes principales.

### 3. CONCLUSIONES

La tabla de composición se unió para formar una matriz de composición-tiempo de recolección. Estos datos se sometieron a análisis de componentes principales, para poder representar en un espacio bidimensional para cada composición con solamente un par de coordenadas. Los resultados obtenidos del estudio circadiano, mostraron que los mayores contenidos de carvona se presentaron en las horas de la noche (34.3%, 30.7% y 31.8%). La mayor diferencia en composición se observó entre las muestras recolectadas a media noche y al medio día (puntos 24 y 12 en la Figura 1).

### 4. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias-CENIVAM Contrato RC 432-2004. Al doctor José L. Fernández, del Herbario Nacional Colombiano (UNAL).

### 5. BIBLIOGRAFÍA

[1] ADAMS, R.P., Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Allured Publishing Corporation. Illinois, 2004, 456 p.

[2] BARRIGA G.H., Flora Medicinal de Colombia Tomo II. 2<sup>ed</sup>. Editorial Tercer Mundo, Bogotá, Colombia. 1992, p. 495.

[3] CAPEL, J.; LOZANO, R.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; y JARILLO, J.A., Ritmos y relojes circadianos de las plantas. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente* (Ecosistemas), 2003, enero-abril.

[4] GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; and VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. *J. Chromatog.*, 1981, 203, p.p. 325-335.

[5] GUPTA, Mahabir. 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. 1<sup>ed</sup>. Bogotá, Colombia: Cytad- Secad. 1995, p. 558.

[6] NÚÑEZ, A., Aislamiento y concentración de trazas orgánicas volátiles en cromatografía gaseosa capilar. CENIC, Ciudad de la Habana, 1986, p.p. 4-20.

[7] PINO ALEA, J.A.; ORTEGA, L.A.; y ROSADO PÉREZ, A., Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba*(Mill.) N.E. Brown. *Rev. Cubana Farm.*, ene-abr. 1996, 30(1).

[8] STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; y MARTÍNEZ, J.R., Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 2003, 27, p.p. 579-597.