

## Determinación del quimiotipo de la fracción volátil del aceite esencial de hojas de albahaca de variedad *ocimum*, por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)

### Chemotype determination of volatile fraction essential oil of leaves of basil *ocimum* variety by a gas chromatography (GC-MS)

Rodríguez H. L. F <sup>I,III</sup>; Giraldo P. G. A. <sup>II</sup> y Murillo P. E. <sup>III</sup>

**Resumen.** El perfil químico volátil del aceite esencial de hojas de albahaca morada grande, variedad *Ocimum*, cultivada en la meseta de Ibagué-Colombia, obtenido por hidrodestilación, se determinó mediante cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) encontrando un contenido en monoterpenos del 47.89% y en sesquiterpenos del 32.39%. Se determinó como quimiotipo al cinamato de metilo con una cantidad relativa del 73.4%, (trans-cinamato de metilo 60.4% y cis-cinamato de metilo 13.0%) y como subtipo el estragol (1-Metoxo-4-(2-propenil)-benceno) determinado en una proporción del 9,8%, el cual se relaciona como una molécula cancerígena.

**Palabras clave:** *Ocimum*, Cinamato de metilo, Estragol, Quimiotipo.

**Abstract.** The chemical profile of volatile essential oil of basil leaves purple large variety *Ocimum* grown in the upland Ibagué, Colombia, obtained by hydrodistillation was determined by gas chromatography coupled to mass (GC-MS) showing a content of 47.89% monoterpenes and sesquiterpenes of 32.39%. Was determined as the methyl cinnamate chemotype with a relative amount of 73.4% (trans-methyl cinnamate and 60.4% cis-methyl cinnamate 13.0%) as subtype estragol (1-methoxy-4-(2-propenyl) benzene) calculated at a rate of 9.8%, which is related as a carcinogenic molecule.

I Estudiante Maestría en Química, Universidad del Quindío.

II Director Grupo de Investigación de Agroindustria de Frutas Tropicales. U. Quindío.

III Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales. U Tolima.

Programa de Maestría en Química, Universidad del Quindío. Email: luferrrodriguez@gmail. com.

**Key words:** *Ocimum*, methyl cinnamate, estragole, chemotype.

## 1. INTRODUCCIÓN

La albahaca (*Ocimum* sp., *Lamiaceae*) un arbusto nativo anual y perenne del trópico y subtropical, en regiones como Asia, África y Suramérica (Darrah, 1988) es reconocida en muchas regiones del mundo esencialmente como una especie aromática; la medicina le atribuye también gran diversidad de usos (Murillo *et al.*, 2002). La taxonomía de esta planta es bastante compleja debido a la hibridación interespecífica, reconociendo más de 150 especies diferentes (Pushpangadan and Bradu, 1995); sin embargo, otros autores han propuesto 65 especies y las otras son consideradas descendencias de las primeras (Paton *et al.*, 1999). La variedad *Ocimum basilicum* L. es la de mayor producción de aceite esencial en el mundo y es la que se cultiva comercialmente en muchos sitios. Este vegetal es fuente de aceite esencial, el que, a su vez, se utiliza como saborizante de alimentos y en productos dentales, perfumería y la industria farmacéutica, entre otros, (Simon *et al.*, 1999). Por las investigaciones realizadas (Phippen *et al.*, 1998, Juliani *et al.*, 2002 y Barzaga *et al.*, 2002) el aceite esencial y el extracto se consideran una fuente de compuestos aromatizantes y con un amplio rango de aplicaciones biológicas como repelente de insectos, nematocida, antibacteriana, antifúngica y antioxidante (Lee *et al.*, 2005, Deshpande and Tipnis, 1977, Simon *et al.*, 1999, Juliani and Simon, 2002) entre otros.

Este estudio pretende determinar el quimiotipo y subtipo del aceite esencial de una albahaca morada grande, variedad *Ocimum*, cultivada en la zona rural de los alrededores de la ciudad de Ibagué, departamento de Tolima (Colombia). El método para determinar el quimiotipo se basa en establecer las cantidades relativas de los componentes químicos de la planta, según lo propuesto por Grayer (1996).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Las plantas de albahaca morada grande, variedad *Ocimum*, cultivadas en la zona rural de los alrededores de la ciudad de Ibagué, Colombia, fueron adquiridas en el mercado local de la ciudad. Para este trabajo se separó manualmente el tejido foliar de los tallos y las hojas se secaron en invernadero durante 36 horas, cuya temperatura osciló entre los 20° y 42°C durante el día, y 15° y 17°C durante la noche, y se almacenaron en bolsas plásticas con cierre hermético.

## 2.2 Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial se realizó por hidrodestilación, empleando un montaje de destilación tipo Clevenger, con una relación tejido foliar:solvente de 1:12. El aceite se separó de la capa acuosa por decantación, se secó con sulfato de sodio y se almacenó en botella oscura a 4°C.

## 2.3 Caracterización fisicoquímica del aceite esencial

Al aceite esencial se le realizaron pruebas de solubilidad; además, se determinó el peso específico, la densidad y el índice de refracción, según Murillo, E. y Méndez, J., 2008.

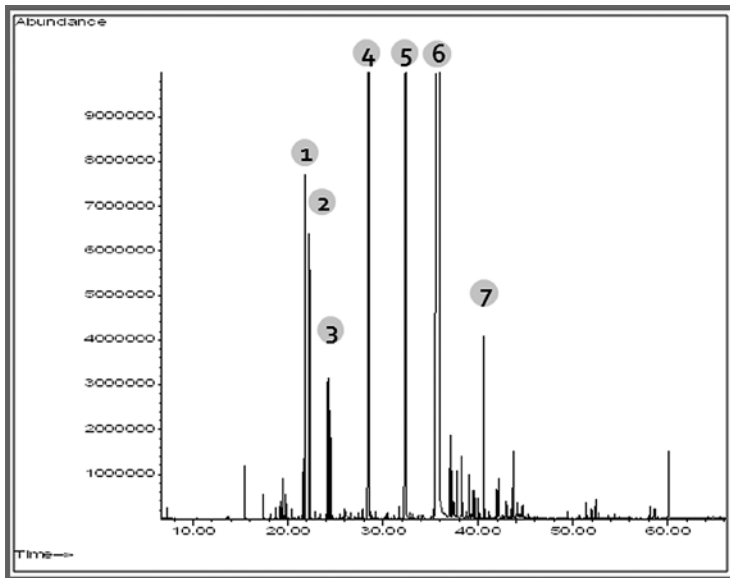
## 2.4 Determinación del perfil químico volátil del aceite esencial

Se realizó mediante GC/MS en un equipo Agilent Technologies 6890, acoplado a un detector selectivo de masas (MSD, Agilent Technologies 5973) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full scan) en el modo split 30:1, con un volumen de inyección de 2 µL. La columna empleada fue una DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) [5%-fenil-poli(dimetilsiloxano). 60 m x 0,25 mm DI x 0,25 µm Recubrimiento]. Se empleó helio como gas de arrastre (1 ml/min). La temperatura del horno se programó desde 50°C (2 min) hasta 250°C a razón de 5 °C/min. Las temperaturas del inyector y detector se fijaron en 250°C. Los compuestos se identificaron con base en sus índices de retención y espectros de masas, empleando las bases de datos de Adams, Wiley 138 y W8N08 y un índice de similaridad mayor al 90%.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción del aceite esencial presentó un rendimiento promedio del 0.92%, con una desviación estándar de 0.22 y un coeficiente de variación de 23.9%. Como resultado de la caracterización fisicoquímica, se determinó el peso específico de 0.6648, la densidad de 1.00 g/mL y el índice de refracción de 1.37. En cuanto a las pruebas de solubilidad, se encontró que el aceite esencial es insoluble en agua, medianamente soluble en etanol/agua, en relación de 35/65 a 45/55, y totalmente soluble a partir de la relación 50/50.

En la figura 1, se muestra el cromatograma (CG) obtenido en la determinación de la composición química de la fracción volátil y semivolátil del aceite esencial de las hojas de albahaca, el cual fue acoplado a espectrometría de masas para la identificación de las diferentes señales.



**Figura 1.** Cromatograma del aceite esencial de hojas de albahaca, operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencias (full scan)

En la caracterización química del aceite esencial de las hojas de albahaca (*ocimum*) se encontraron 68 señales que correspondieron a 71 compuestos, de los cuales se identificaron 65 de ellos con base en sus índices de Kovats. En el cromatograma, figura 1, se destacan con los números del 1 al 7 los compuestos que presentaron mayor cantidad relativa.

**TABLA 1.** Composición química del aceite esencial, cantidad relativa e índices de Kovats calculados

	COMPUESTO	CANTIDAD RELATIVA	IK CALCULADO
1	Estireno	0, 4	893, 70
2	$\alpha$ -Pinoeno	0, 2	1037, 63
3	Canfeno	<0, 1	1054, 88
4	Benzaldehído	0, 1	765, 41
5	Sabineno	0, 1	1076, 61
6	1-Octen-3-ol	<0, 1	880, 42
7	$\beta$ -Pinoeno	0, 3	1082, 66
8	3-Octanona	<0, 1	885, 80
9	$\beta$ -Mirceno	0, 2	1090, 50
10	Octanal*	0, 1	804, 19
11	$\alpha$ -Terpineno	<0, 1	1020, 87
12	p-Cimeno	<0, 1	1028, 73
13	Limoneno	0, 5	1033, 97
14	1, 8-Cineol	2, 8	1038, 26
15	trans- $\beta$ -Ocimeno	2, 2	1048, 74
16	$\gamma$ -Terpineno	0, 1	1062, 55
17	cis-Hidrato de sabineno	<0, 1	1075, 42
18	Terpinoleno	<0, 1	1090, 19
19	Fenchona	1, 1	1095, 43
20	Linalool	0, 8	1001, 48
21	Acetato de 1-octen-3-ilo*	<0, 1	1006, 32
22	endo-Fenchol	<0, 1	1026, 45
23	Epoxi-ocimeno*	0, 1	1041, 22
24	Alcanfor	0, 1	1056, 76
25	$\delta$ -Terpineol*	<0, 1	1076, 89
26	Terpinen-4-ol	0, 1	1087, 85
27	Estragol o metilchavicol	9, 8	1004, 71
28	Acetato de octilo*	0, 1	1009, 34
29	2-metil-1-octen-3-ino*	<0, 1	912, 88
30	Acetato de fenchilo*	<0, 1	1224, 04
31	Chavicol + cis-Anetol	0, 1	57, 80
32	Acetato de bornilo + trans-Anetol	0, 2	91, 56
33	cis-Cinamato de metilo	13	1010, 38
34	Metilgeraniato*	<0, 1	1121, 80
35	$\alpha$ -Copaeno	0, 1	1587, 20
36	trans-Cinamato de metilo	60, 4	1000, 79
37	trans- $\beta$ -Cariofileno	0, 6	1536, 06
38	cis- $\alpha$ -Bergamoteno	0, 3	1542, 23

39	$\alpha$ -Guaieno	0, 1	1546, 93
40	Sesquisabineno + cis-Cinamato de etilo	0, 1	49, 28
41	trans- $\beta$ -Farneseno	0, 3	1556, 04
42	$\alpha$ -Humuleno	0, 4	1571, 03
43	trans-Cinamato de etilo	0, 1	1173, 96
44	ar-Curcumeno	0, 1	1587, 78
45	Germacreno D	0, 4	1594, 53
46	$\alpha$ -Zingibireno	<0, 1	1500, 47
47	Biciclogermacreno	0, 2	1508, 83
48	$\beta$ -Bisaboleno	0, 2	1513, 84
49	$\gamma$ -Cadineno	0, 1	1525, 54
50	$\delta$ -Cadineno	<0, 1	1528, 22
51	trans- $\alpha$ -Bisaboleno	1, 3	1546, 94
52	trans-Nerolidol	0, 1	1564, 99
53	Espatulenol	0, 2	1591, 41
54	Oxido de cariofileno	0, 4	1598, 76
55	Oxido de humuleno	0, 1	1527, 17
56	1, 10-di-epi-Cubenol	0, 1	1529, 43
57	Jasmonato de metilo	0, 1	1347, 46
58	epi-Biciclosesquifelandreno	0, 5	54, 60
59	$\beta$ -Eudesmol	0, 1	1571, 89
60	$\alpha$ -Bisabolol	0, 1	1593, 31
61	Eicosatrienoato de metilo	<0, 1	2196, 13
62	N. I. (M+ 298)	0, 1	-----
63	N. I. (m+ 298)	0, 1	-----
64	N. I. (M+ 298)	0, 1	-----
65	N. I. (M+ 298)	0, 1	-----
66	Compuesto oxigenado, N. I	0, 1	-----
67	Compuesto oxigenado, N. I	0, 1	-----
68	Adipato de di (2-etilhexilo)	0, 5	2287, 70

Como se observa en la tabla 1 y la figura 1, los principales componentes del aceite esencial de albahaca, según el orden en el que eluyeron, son: 1. 1,8-cineol, 2.8%, IK. 1038,26; 2. *trans*- $\beta$ -ocimeno, 2.2%, IK. 1048,74; 3. Fenchona, 1.1%, IK. 1095,43; 4. Estragol, 9.8%, IK. 1004,71; 5. *cis*-cinamato de metilo, IK. 1010,38; 6. *trans*-cinamato de metilo, 60.4%, IK. 1000,79 y 7. *Trans*- $\alpha$ -bisaboleno, 1.3%, IK. 1546,94.

El resto de compuestos identificados se encontraron en proporciones menores al 1%. De esta manera, y como recomendó Grayer (1996) se define el quimiotipo de esta variedad de albahaca como el cinamato de metilo en sus formas químicas *trans*-

cinamato de metilo, 60.4%, y *cis*-cinamato de metilo, 13.0%, debido a que los otros compuestos se encontraron por debajo del 20%, lo que indica que la ruta biosintética que predomina en esta variedad de albahaca, es la ruta del ácido cinámico, y concuerda con lo reportado por Viña y Murillo (2003) en diferentes variedades de albahaca del departamento del Tolima.

Este resultado concuerda con la clasificación geográfica realizada por diferentes investigadores como Lachowicz *et al.* (1997), Vernin y Metzger, (1984) y Simon *et al.* (1999), donde se define el quimiotipo tropical como cinamato de metilo, siendo de elevada importancia para la industria de la perfumería. Telci *et al.* (2006), y Viña y Murillo, (2003), reportaron, entre las especies de estudio, al cinamato de metilo como uno de los quimiotipos más importantes, reafirmando al cinamato de metilo como el quimiotipo tropical.

De igual manera, en la tabla 1 se presentan los índices de Kovats, calculados para los compuestos que eluyeron en el aceite esencial de albahaca, según los datos obtenidos en la cromatografía de gases (CG-MS) realizada a la mezcla certificada de hidrocarburos C<sub>7</sub>-C<sub>25</sub>, Part N° AK-101.0-NAS-10X y AK-102.0-NAS-10X (*AccuStandar, Inc., 125 Market Street, New Haven, CT 06513*) operada en el modo full Scan.

Según los resultados de la composición química de la fracción volátil del aceite esencial, se puede considerar al estragol (1-Metoxi-4-(2-propenil)-benceno) como el subtipo, el cual fue determinado en una proporción del 9,8%. A este compuesto, y a algunos relacionados estructuralmente, se les ha encontrado propiedades cancerígenas (Telci *et al.* 2006, Liu *et al.* 1999, Johnson *et al.* 2000 y Miller *et al.* 1983) y genotóxicas, Munerato *et al.* (2005). Estados Unidos y Europa tienen reglamentada la restricción sobre el uso del estragol como aditivo aromatizante en alimentos (Council Directive 88/388/EEC, 1988, y Decreto Legislativo, 1992) debido a su toxicidad. De igual manera, Alemania prohibió el uso de estragol como aditivo de alimentos Bunesgesetzblatt (2001). Siano *et al.* (2003) reportaron contenidos de estragol, y compuestos relacionados como el safrol y el eugenol, en diferentes alimentos como salsa de tomate, salsa pesto o albahacas frescas. Viña y Murillo (2003) encontraron el 33% de las especies estudiadas con contenidos de estragol, comprendidos entre el 5,78% y el 12,33%.

De igual modo, se determinó que el aceite esencial es una mezcla compleja de monoterpenos en 47.89%, sesquiterpenos en 32.39%, hemiterpenos en 8.45%, diterpenos en 1.41% y triterpenos en 1.41%, con una proporción de terpenos oxigenados del

56.34% e hidrocarbonados del 43,66%; así mismo, Telci *et al.* (2006) reportaron que las especies en estudio presentaron monoterpenos en proporciones similares.

#### 4. CONCLUSIONES

Al encontrar, en comparación con los otros componentes químicos de la fracción volátil del aceite esencial, una elevada proporción de estragol, 9,8% (1-Metoxi-4-(2-propenil)-benceno) en la composición del aceite esencial de la albahaca, y relacionarlo como una molécula cancerígena (Telci *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 1999, Johnson *et al.*, 2000 y Miller *et al.*, 1983) no se recomienda el uso del aceite esencial como aditivo alimentario, y se sugiere realizar la caracterización del perfil químico del aceite esencial al mismo cultivar cosechado en diferentes épocas del año, para determinar la influencia climática y edafológica sobre la composición química de la planta, principalmente el contenido de estragol.

El quimiotipo del aceite esencial de las hojas de albahaca es el cinamato de metilo, en sus formas químicas, trans-cinamato de metilo (60,4%) y cis-cinamato de metilo (13,0%) lo que permite inferir que la ruta biosintética de este cultivar es la del ácido cinámico.

El perfil químico volátil del aceite esencial de hojas de albahaca morada grande, variedad *Ocimum*, cultivada en la meseta de Ibagué, Colombia, se caracterizó por un alto contenido de monoterpenos (47.89%) y sesquiterpenos (32.39%).

#### AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la dirección de la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima, al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander y al laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidad del Tolima, sin quienes no se podría haber desarrollado este trabajo.

#### BIBLIOGRAFÍA

Barzaga, P. G., Nuñez, Y., Carrillo, C., Chavez, I., Gonzalez, M. L., Gonzalez, R., (2002). Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. en ratas. *Rev Cubana Farm.* 36 (Suplemento Especial No 2): 74-7. *Bundesgesetzblatt, teil 1*, (2001). No. 28 of 25 June.

Council Directive 88/388/EEC—of 22 June 1988. On the approximation of the laws of the

- Member States relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. Official Journal L 184.
- Darrah, H. H., (1988). *The Cultivated Basil*. Buckeye Printing, Independence, MO.
- Decreto Legislativo 25 gennaio 1992, N.107. Attuazione delle direttive 88/388/CEE e 91/71/CEE (1992). Relative agli aromi destinati ad essere impiegati nei prodotti alimentari di base per la loro preparazione. Gazzetta Ufficiale n. 39.
- Deshpande, R. S., Tipnis, H. P., (1977). Insecticidal activity of *Ocimum basilicum* L.. Pesticides, 11, 1-12.
- Grayer, R. J., Kite, G. C., Goldstone, F. J., Bryan, S. E., Paton, A., Putievsky, E., (1996). Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. Phytochemistry 43, 1033-1039.
- Johnson, J. D., Ryan, M. J., Toft, J. D. II., Graves, S. W., Hejtmančík, M. R., Cunningham, M. L., Herbert, R., Abdo, K. M., (2000). Two-year toxicity and carcinogenicity study of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F1 Mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 3620–3632.
- Juliani, H. R., Simon, J. E., (2002). Antioxidant activity of basil. P. 575-579. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.). *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, V.A.
- Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu, F. E., Palmer, M. V., Mishra, V., Hunter, M. M.. (1997). Characteristics of plants and plant extracts from five varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. J. Agric. Food Chem. 45, 2660-2665.
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K. G., (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem. 91, 131-137.
- Liu T. Y., Chen C. C., Chen C., L., Chi C. W., (1999). Safrole-induced oxidative damage in the liver of Sprague-dawley rats. Food and Chemical Toxicology, 37, 697-702
- Miller, E. C., Swanson, A. P., Philips, D. H., Fletcher, T. L., Liem, A., Miller, J. A., (1983). Structure–activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkylbenzene derivatives related to safrole and estragole. Cancer Research, 43, 1124–1134.
- Munerato, M. C., Sinigaglia M., Reguly M. L., Rodriguez de Andrade H. H., (2005). Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 582, 87–94.
- Murillo, E., Viña A. y Correa I. L. (2002). Actividad antifúngica y composición química del aceite esencial de doce variedades de *Ocimum sp.* cultivadas en Ibagué-Colombia. *Información Tecnológica*. Vol 13 (1): 77-85.

- Murillo, E., Méndez, J., (2008). Guía metodológica para la detección rápida de algunos núcleos secundarios y caracterización de una droga cruda. Departamento de química. Facultad de ciencias. Universidad del Tolima. Ibagué.
- Paton, A., Harley, R.M., Harley, M.M., (1999). *Ocimum* e an overview of relationships and classification. In: Holm, Y., Hiltunen, R. (Eds.). Medicinal and Aromatic Plants e Industrial Profiles. Harwood Academic, Amsterdam, pp. 1-38.
- Phippen, W. B., Simon, J. E., (1998). Anthocyaninis in basil (*Ocimum basilicum* L.). J. Agr. Food Chem. 46:1734-1738.
- Pushpangadan, P., Bradu, B.L., (1995).Basil. In: Chadha, K.L., Gupta, R. (Eds.). Advances in Horticulture, Medicinal and Aromatic Plants. vol. 11. Malhotra Publishing House, New Delhi, pp. 627-657.
- Siano, F., Ghizzonib, C., Gionfriddoa, F., Colombob, E., Servilloc, L., Castaldoa D., (2003). Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products. Food Chemistry 81 469–475.
- Simon, J. E., Quinn, J., Murray, R. G., (1999). Basil: a source of essential oils. In: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.). Advanced in New Crops. Timber Press, Portland, OR, pp. 484-489.
- Telci, I., Bayram, E., Yılmaz,G., Avcı B., (2006).Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.) Biochemical. Systematics and Ecology 34 489-497.
- Vernin, G., Metzger, J., (1984). Analysis of basil oils by GCeMS data bank.Perfum. Flavor, 9, 71-86.
- Viña, A., Murillo E., (2003). Essential oil composition from twelve varieties of Basil (*Ocimum spp*) grown in Colombia. J. Braz. Chem. Soc. Vol. 14, No. 5, 744-749

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Rodríguez, H. L. F. ; Giraldo P. G. A. y Murillo, P. E. Determinación del quimiotipo de la fracción volátil del aceite esencial de hojas de albahaca de variedad <i>ocimum</i> , por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) Revista Tumbaga (2011), 6, 53-62	Día/mes/año 26/08/2011	Día/mes/año 16/09/2011