

# Composición Química y Actividad Antimicótica de el Aceite Esencial de la *Lepechinia schiedeana* (Schlecht)Vatke

LUIS B. ROJAS<sup>1</sup>\*, ALFREDO USUBILLAGA<sup>1</sup>, JESÚS A. CEGARRA<sup>2</sup>,  
EGLEE BORREGALES<sup>3</sup> Y SARELIA CARRERO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigación, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. <sup>2</sup> Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela <sup>3</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

## RESUMEN

La destilación por arrastre de vapor de ramas y hojas frescas de *Lepechinia schiedeana* tiene un rendimiento de 0,26% en aceite esencial. El análisis del aceite esencial mediante cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a masas, permitió identificar 30 componentes que constituían el 97,6% del aceite. Los compuestos más abundantes fueron el ledol (29,1%), el  $\Delta^3$ -careno (18,4%) y el  $\alpha$ -cadinol (9,6%). El ledol fue aislado en forma cristalina e identificado mediante resonancia protónica y de carbono 13. El aceite muestra actividad antimicótica ante *Candida albicans*.

## PALABRAS CLAVE

*Lepechinia schiedeana*, Lamiaceae, aceite esencial, ledol, sesquiterpenos.

## ABSTRACT

Steam distillation of fresh stems and leaves of *Lepechinia schiedeana* (Schlecht) Vatke yielded 0.26% of essential oil. GC and GC/MS analyses permitted the identification of 30 compounds which made up 97.6% of the oil. The most abundant constituents were ledol (29.1%),  $\Delta^3$ -carene (18.4%), and  $\alpha$ -cadinol (9.6%). Ledol was isolated as crystals and identified by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR. The oil exhibited anti-mycotic activity against *Candida albicans*.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al CDCHT por la ayuda financiera brindada a través del Proyecto FA-246-00-08-B.

## INTRODUCCIÓN

Desde el Sur Oeste de los Estados Unidos hasta Chile existen unas 40 especies de *Lepechinia* (*Labiatae*) (Delgado *et al*, 1994; Lawrence, 1981; Epling, 1948). Algunas de estas plantas son usadas por sus propiedades antitumorales, insulino-miméticas (Alarcón-Aguilera *et al*, 1998), para tratar infecciones urinarias ó calmar dolores de estómago (Delgado *et al*, 1994). Tanto sesquiterpenos (Ahmed *et al*, 1996), como diterpenos (Delgado *et al*, 1992; Bruno *et al*, 1991; Dimayuga *et al*, 1991; Ahmed *et al*, 1995; Jonathan *et al*, 1989) y flavanoides (Delgado *et al*, 1994) han sido aislados de diferentes especies de este género. Se ha estudiado el aceite esencial de *L. floribunda* (Velasco-Neguerela *et al*, 1994), *L. calcyna* (Lawrence and Morton, 1979), *L. salviaefolia* (Eggers *et al*, 2001), *L. urbanii* (Zanoni *et al*, 1991), *L. salviae* (Montes *et al*, 1983), y *L. graveolens* (Riscala y Retamar, 1973). *L. schiedeana* ha sido descrita en Venezuela, Colombia, America Central, Mexico, y California (Lawrence, 1981; Epling (1948). En un estudio previo del aceite esencial de esta planta, recolectada en California (Lawrence, 1981) se reportó  $\beta$ -pineno (75%) como el constituyente más abundante. Por otra parte estudios realizados en Colombia (Stashenko *et al*, 1999), utilizando varias técnicas de extracción, demostraron que el ledol era el compuesto más abundante de su aceite esencial (20,04-36,87%). En cambio en Costa Rica Ciccio *et al* (1999) encontraron que el aceite esencial de *L. schiedeana* contenía 51 componentes entre los cuales  $\beta$ -pineno (26,6%), cispinocanfona (25,1%),  $\Delta$ -3-carene (6,1%), transpinocanfona (4,0%), alcanfor (3,8%) and  $\beta$ -cariofileno (3,7%) eran los componentes más importantes. Se ha evaluado, mediante cromatografía de gases (Stashenko *et al*, 1999), la actividad antioxidante de los compuestos carbonílicos volátiles del aceite esencial de *L. schiedeana*.

## MATERIALES Y METODOS

Se recolectó partes aéreas de *L. schiedeana* en el Páramo de la Culata, Estado Mérida, a 3000 m de altura. Se ha depositado una muestra testigo (L. B. Rojas 09) en el Herbario de la Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes. La planta fue identificada botánicamente por Jesús A. Cegarra. Se realizó durante tres horas una hidrodestilación de tallos y hojas frescas (800g) obteniéndose 2,1 g de aceite esencial.

Se analizó el aceite en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer modelo Autosystem sobre una columna capilar con un diámetro de 0,25 mm, una longitud de 60 metros y una película de metilpolisiloxano de 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor. Se utilizó una temperatura de inyección de 200  $^{\circ}\text{C}$  y el detector se mantuvo a 250  $^{\circ}\text{C}$ . Se usó Helio como gas portador con un flujo de 0,8 ml/min. El horno se programó desde una temperatura inicial de 60  $^{\circ}\text{C}$  (1,0 min) hasta 200  $^{\circ}\text{C}$  elevando la temperatura a razón de 4  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , finalmente se mantuvo durante 20 minutos la temperatura a 200  $^{\circ}\text{C}$ . Se inyectó una muestra de 1,0  $\mu\text{L}$  con reparto de 100:1. La muestra se preparó diluyendo 20  $\mu\text{L}$  en 1,0 mL de éter dietílico. Se determinaron los índices de Kovats analizando conjuntamente la muestra con una mezcla de n-alcenos ( $\text{C}_8$  a  $\text{C}_{22}$ ) (Adams, 2001; Davies, 1990).

Los espectros de masas se realizaron en un equipo Hewlett Packard 5973 GC/MS a 70 eV, equipado con un inyector automático, utilizando una columna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ). El programa de temperatura utilizado fue el mismo que se indicó para el análisis cromatográfico. Se inyectó una muestra de 1,0  $\mu\text{L}$  de una solución al 2% del aceite esencial en n-heptano con reparto de 100:1. Se utilizó una temperatura de inyección de 200  $^{\circ}\text{C}$ . La identificación de los componentes del aceite se realizó mediante comparación computerizada de los espectros obtenidos con los espectros de una Librería Wiley (6<sup>a</sup> Edición).

Los espectros de resonancia de protones y de carbono 13 se midieron en solución de  $\text{CDCl}_3$  en un espectrómetro Bruker Modelo Avance de 400 MHz. Las asignaciones se hicieron con ayuda de un espectro DEPT y experimentos bidimensionales (H-H COSY, HMQC y HMBC).

Se evaluó la actividad antimicótica inoculando por duplicado *Candida albicans*, *trichophyton mentagrophytes*, y *Trichophyton rubrum* en cápsulas Petri que contenían medio de dextrosa tipo Sabouraud. Se impregnó con el aceite esencial cinco círculos de papel filtro esterilizado, que fueron colocados sobre las cápsulas Petri e incubados a 22-25  $^{\circ}\text{C}$ . Después de cinco días de incubación las cápsulas inoculadas con *C. albicans* mostraron un halo de inhibición de 0,5-0,6 cm alrededor de los círculos de papel. Transcurridos 15 días

no se observó halos de inhibición en los círculos impregnados con *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La hidrodestilación de las hojas frescas de *L. schiedeana* produjo 0,26% de aceite el cual fue analizado por cromatografía de gases con detector de ionización a llama y cromatografía de gases acoplada a un detector de masas. Se presenta la composición del aceite esencial en la Tabla 1. El porcentaje de cada componente en el aceite se calculó del cromatograma mediante normalización de las áreas de los picos. Se logró identificar 30 componentes mediante comparación computerizada de los espectros de masas de los componentes eluidos de la columna cromatográfica con los espectros de masas de la Librería Wiley. Se confirmó la identificación mediante cálculo de los índices de Kovats y en algunos casos mediante comparación directa con compuestos patrón existentes en el laboratorio. Los monoterpenos constituían un 46,05% del aceite y los sesquiterpenos el 50,19%. El componente más abundante, el ledol, cristalizó al enfriar el aceite. Se obtuvo ledol puro con un punto de fusión de 102-3  $^{\circ}\text{C}$  mediante recristalización en hexano. Se confirmó la identificación del ledol mediante análisis y asignación de los espectros de resonancia magnética nuclear tanto de protones como de carbono 13. RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,34 (1H, dd, J=10, 9,4 Hz, 6-H), 0,71 (1H, ddd, J=9,4, 9,0 y 6,5 Hz, 7-H), 0,95 (3H, d, J= 6,9 Hz, 14-H), 0,998 (3H, s, 12-H), 1,055 (3H, s, 13-H), 1,16 (3H, s, 14-H), 1,22 (1H, m, 8 $\beta$ -H), 1,30 (1H, m, 3 $\beta$ -H), 1,69 (1H, m, 9 $\beta$ -H), 1,70 (1H, m, 3 $\alpha$ -H), 1,73 (1H, m, 2 $\beta$ -H), 1,78 (1H, m, 8 $\beta$ -H), 1,80 (1H, m, 9 $\alpha$ -H), 1,84 (1H, m, 8 $\alpha$ -H), 1,91 (1H, m, 2 $\alpha$ -H), 2,01 (1H, dt, J= 3,9 y 2,8 Hz, 4-H), 2,16 (1H, dt, J= 6,6 y 1,5 Hz, 1-H); NMR- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm): 53,47 (1), 24,36 (2), 30,56 (3), 38,18 (4), 40,53 (5), 23,14 (6), 24,73 (7), 20,05 (8), 38,96 (9), 74,65 (10), 19,20 (11), 15,74 (12), 28,41 (13), 30,26 (14) y 15,17 (15). Estos valores concuerdan con los datos publicados en la literatura (Satyesh *et al*, 1980)). En la Figura 1 se presenta la estructura del ledol.

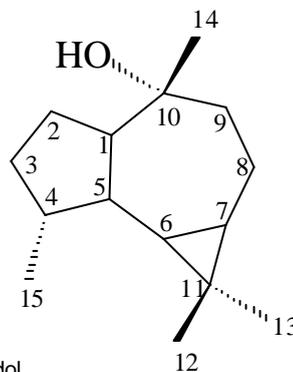


Figura 1. Ledol

**Tabla 1.** Composición del aceite esencial de la *Lepechinia schiedeana*.

Nº	Componente	Concentración (%)	IR	Identificación
1	$\alpha$ -tujeno	0.3	920	GC-MS, IR <sup>1</sup>
2	$\alpha$ -pineno	2.0	932	GC-MS, IR <sup>1</sup> , P
3	canfeno	0.2	949	GC-MS, IR <sup>1</sup>
4	$\beta$ -pineno	7.8	970	GC-MS, IR <sup>1</sup> , P
5	6-metil-5-hepten-2-ona	0.3	985	GC-MS, IR <sup>1</sup>
6	$\beta$ -mirreno	0.3	993	GC-MS, IR <sup>1</sup> , P
7	$\alpha$ -felandreno	1.5	1001	GC-MS, IR <sup>1</sup>
8	$\delta$ -3-careno	18.4	1010	GC-MS, IR <sup>1</sup>
9	$\alpha$ -terpineno	0.5	1015	GC-MS, IR <sup>1</sup>
10	p-cimeno	0.7	1022	GC-MS, IR <sup>1</sup>
11	o-cimeno	1.3	1024	GC-MS, IR <sup>1</sup>
12	$\beta$ -felandreno	9.6	1030	GC-MS, IR <sup>1</sup>
13	cis-ocimeno	0.3	1035	GC-MS, IR <sup>1</sup>
14	$\gamma$ -terpinene	0.7	1053	GC-MS, IR <sup>1</sup>
15	$\alpha$ -terpinoleno	1.7	1080	GC-MS, IR <sup>1</sup>
16	linalool	0.3	1095	GC-MS, IR <sup>1</sup> , P
17	4-terpineol	0.6	1170	GC-MS, IR <sup>1</sup>
18	$\alpha$ -terpineol	0.5	1186	GC-MS, IR <sup>1</sup>
19	$\alpha$ -gurjuneno	0.7	1405	GC-MS, IR <sup>1</sup>
20	$\beta$ -gurjuneno	0.4	1430	GC-MS, IR <sup>1</sup>
21	$\alpha$ -bergamoteno	1.7	1434	GC-MS, IR <sup>1</sup>
22	aromadendreno	1.5	1440	GC-MS, IR <sup>1</sup>
23	$\alpha$ -farneseno	0.5	1500	GC-MS, IR <sup>1</sup>
24	$\gamma$ -cadineno	1.7	1511	GC-MS, IR <sup>1</sup>
25	cis-calameneno	0.5	1538	GC-MS, IR <sup>1</sup>
26	palustrol	1.6	1550	GC-MS, IR <sup>1</sup>
27	ledol	29.1	1565	GC-MS, IR <sup>1</sup> , RMN
28	dillapiol	2.6	1620	GC-MS, IR <sup>1</sup>
29	cubenol	2.4	1643	GC-MS, IR <sup>1</sup>
30	$\alpha$ -cadinol	7.9	1650	GC-MS, IR <sup>1</sup>

Identificación: GC-MS = cromatografía de gases/ espectrometría de masas; IR<sup>1</sup> = Índice de Kováts en columna AT-5; P = compuesto patrón; RMN = Resonancia Magnética Nuclear.

La actividad biológica del aceite esencial se ensayó *in vitro* en *Candida albicans*, *Trichophytes rubrum*, y *Trichophytes mentagrophytes*. Cinco días después del inicio del experimento las cápsulas Petri inoculadas con *Candida albicans* desarrollaron un halo de inhibición de 0,5-0,6 cm. Aquellas cápsulas inoculadas con *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* no mostraron ninguna actividad aún después de quince días. Todos estos ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

El ledol es el compuesto más abundante en el aceite de la *L. schiedeana* recolectada tanto en Venezuela como en Colombia. Sin embargo especímenes recolectados en Costa Rica producen un aceite que posee una composición completamente diferente. Probablemente la *L. schiedeana* nativa de Costa Rica es una variedad diferente de la que se encuentra en Venezuela y Colombia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, R.P., 2001. **Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Allured Pub. Corp., Carol Stream, Illinois, 466pp.

Ahmed, A.A.; Hussein, N.S.; Arias de Adams, A.; y Mabry, T.J., 1995. **Abietane diterpenes from *Lepechinia urbaniana***. Pharmazie. 50 : 270.

Ahmed, A.A.; Aboul Ela, M.; Arias de Adams, A.; Mabry, T.J., 1996. **Sesquiterpenes from *Lepechinia urbaniana***. Planta Medica 62 : 385-386.

Alarcon-Aguilera F J; Roman-Ramos R; Perez-Gutierrez S; Aguilar-Contreras A; Contreras-Weber C. C.; Flores-Saenz J. L., 1998. **Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics**. Journal of Ethnopharmacology 61(2): 101-110.

Bruno, M.; Savona, G.; Piozzi, F.; De La Torre, M.C.; Rodriguez, B.; Marlier, M., 1991. **Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeri* and *Lepechinia hastata***. Phytochemistry, 30(7) : 2339-2343.

Ciccio J F; Soto V H; Poveda L. J., 1999. **Essential oil of *Lepechinia schiedeana* (Lamiaceae) from Costa Rica**. Revista de Biología Tropical 47(3) : 373-5.

Davies, N.W., 1990. **Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases**. Journal of Chromatography, 503 : 1-24.

Delgado, G; Sanchez, E.; Hernandez, J.; Chavez, M.I., Alvarez, L.; y Martinez, E., 1992. **Abietanoic acid from *Lepechinia caulescens***. Phytochemistry 31(9): 3159-3161.

Delgado, G.; Hernandez, J.; Chavez, M.I.; Alvarez, L.; Gonzaga, V.; y Martinez, E., 1994. **Di- and triterpenoid acids from *Lepechinia caulescens***. Phytochemistry. 37 (4): 1119-1121.

Dimayuga, R.E.; Keer Garcia, S.; Per Halfdan N.; y Christophersen, C., 1991. **Traditional medicine of Baja California Sur (México) III. Carnosol: a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata***. Journal of Ethnopharmacology, 31: 43-48.

Eggers, M. D.; Orsini, G.; Stahl-Biskup, E., 2001. **Composition and chemical variation of the essential oil of *Lepechinia salviaefolia* (Kunth) Epl. from Venezuela**. J. Ess. Oil Res. 13(1): 1-4.

Epling, C., 1948. **A synopsis of the tribe Lepechinieae (Labiatae)**. Brittonia. vol: 6 : 352-362.

Gijzen, H.J.M.; Wijnberg J.; Stork, G. A.; De Groot, A., 1992. **The synthesis of mono- and dihydroxy aromadendrane sesquiterpenes, starting from natural (+)-aromadendrene- III**. Tetrahedrom. 48 : 2465-2476.

Jonathan, L.T.; Che, Chu-Tao; Pezzuto, J.M.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R., 1989. **7-O-methylhorminone and other cytotoxic diterpene quinones from**

***Lepechinia bullata***. Journal of Natural Products. 52(3): 571-575.

Lawrence, B.M.; Morton, J.K., 1979. **Volatile Constituents of *Lepechinia calcyna***. Phytochemistry. 18: 1887.

Lawrence, B.M., 1981. **Essential Oils 1979-1980**. Allured Publishing Corp. Wheaton , USA, Pag. 64.

Montes G., M. A.; Valenzuela R., L.; Wilkomirsky F. T., 1983. **Essential oil of *Lepechinia salviae* (Lindl.) Ep. An. R. Acad. Farm. 49(2) : 257-61.**

Riscalá, E. C.; Retamar, J. A. , 1973. **Essential oils of Tucuman province. Essence of *Lepechinia graveolens***. De Arch. Bioquim., Quim. Farm. 18 : 25-8.

Satyesh C. Pakrashi, Partha P. Ghosh Dastidar, Sarmistha Chakrabarty y Basudeb Achari. 1980. **(12S)-7,12-secoishwaran-12-ol, a new type of sesquiterpene**

**from *Aristolochia indica* Linn.** J. Org. Chem. 45:4765-4767.

Stashenko, E.; Cervantes, M.; Combariza; Y., Fuentes, H.; Martinez, J.R., 1999. **HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia schiedeana*, and in vitro evaluation of its antioxidant activity**. Journal of High Resolution Chromatography 22(6) : 343-349.

Velasco-Negueruela, A.; Perez-Alonso, M.J.; Esteban, J.L.; Guzman, C.A.; Zygodlo, J.A.; y Ariza-Espinar, L., 1994. **Essential oil of *Lepechinia floribunda* (Benth) Epl. J. Ess. Oil Res. 6 : 539-540.**

Zanoni, T. A.; Adams, R. P. 1991. **Essential oils of plants from Hispaniola: 5. The volatile leaf oil of *Lepechinia urbanii* (Briq.) Epling (Lamiaceae)**. Flavour & Fragrance J. 6(1) : 75-7.