



Caracterización por cromatografía de gases y evaluación de la actividad citotóxica del aceite esencial de *Salvia occidentalis* Sw. (Lamiaceae) proveniente del estado Monagas, Venezuela

José G. Lanza^{1,3}, Shailili Moreno^{2,3}, Shelby Ortiz³ y Juan C. Fuentes³

- 1) Laboratorio de Comportamiento y Manejo de Plagas, Universidad Simón Bolívar (USB).
Valle de Sartenejas, Venezuela.
- 2) Laboratorio de Fitoquímica Biodirigida, USB. Valle de Sartenejas, Venezuela.
- 3) Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre,
Universidad de Oriente. Estado Sucre, Venezuela.

(*) joseglanza82@gmail.com

Recibido: 25/07/2010

Revisado: 27/10/2010

Aceptado: 09/12/2010

Resumen:

De las hojas de *Salvia occidentalis* Sw. (Lamiaceae), colectadas en Venezuela, estado Monagas, se obtuvo un aceite esencial empleando la técnica de arrastre con vapor. El aceite es amarillo claro y de olor agradable, su actividad tóxica fue determinada por el ensayo sobre nauplios de *Artemia salina* Linn., mostrando un CL_{50} de $2,60\mu\text{g.mL}^{-1}$. Este valor indica que el aceite esencial es un posible agente citotóxico. De su análisis mediante CG/EM se determinó que el aceite esencial es una mezcla de compuestos terpenoidales, donde el β -elemeno (20,348%) es el componente mayoritario. La identificación de los compuestos químicos fue realizada mediante la comparación de los índices de retención experimentales con respecto a los teóricos señalados en la literatura. Este es el primer reporte de compuestos químicos identificados para este aceite esencial.

Palabras clave: Aceite esencial; *Artemia salina*; *Salvia occidentalis* Sw.; citotoxicidad: CG/EM

Abstract

From the leaves of *Salvia occidentalis* Sw. (Lamiaceae), collected in Venezuela, Monagas state, an essential oil was obtained by steam distillation. It is a yellow oil with an agreeable odor, and its toxic activity was determined by the brine shrimp *Artemia salina* Linn. assay. The essential oil had a LC_{50} value of $2.60\mu\text{g/mL}^{-1}$ which indicate cytotoxicity. GC/MS analysis showed that the oil is a mixture of some terpenes, where β -elemene (20,348%) is the major constituent. The identification of compounds was determined by comparing the experimental retention index with those reported in the literature. This is the first report of chemical compounds for this essential oil.

Keywords: Essential oil; *Artemia salina*; *Salvia occidentalis* Sw.; cytotoxicity; GC/MS

Introducción

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas complejas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas, que representan pequeñas cantidades con respecto a la masa total de la planta, de donde son emitidos. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados. Otros compuestos muy frecuentes, en las esencias, pueden ser derivados biogenéticamente del ácido mevalónico y se les cataloga como monoterpenoides y sesquiterpenoides¹. Muchas han sido las investigaciones sobre caracterización de los compuestos bioactivos de aceites esenciales: Menta (*Mentha piperita*), Orégano

(*Origanum* sp.), Salvia (*Salvia officinalis*), entre otros; en la mayoría de ellos los autores enumeran una serie de propiedades biológicas, las cuales no pueden ser atribuidas a un compuesto en particular, aunque en muchos casos se puede tratar de un compuesto mayoritario responsable de gran parte de la actividad². Por otra parte, se ha demostrado que la actividad biológica presente en la mayoría de los aceites esenciales es debida a la presencia y contribución principal de compuestos de origen terpenoidal e hidrocarburos saturados³.

En los últimos años se han dirigido algunos estudios hacia la búsqueda de actividad de tipo antimicrobiana, citotóxica y antiviral de los aceites esenciales derivados de especies

de *Salvia* y sus principales componentes⁴. Tal es el caso de *S. fruticosa*⁵, *S. tomentosa*⁶, *S. officinalis* y *S. triloba*⁷ o *S. aucheri*, *S. aramiensis* y *S. pilifera*⁸, donde los principales componentes identificados (alcanfor, tuyaona y 1,8-cineol) en algunos de sus aceites esenciales presentaron actividad antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas o actividad antiviral contra el virus del herpes tipo I, el cual es ubicuo a los seres humanos⁵. Las especies del género *Salvia*, pertenecen a la familia *Lamiaceae*; el nombre *Salvia* es derivado del latín *salvare* que significa “para ser salvos”. El género se distribuye en todo el viejo mundo y el continente americano, con tres regiones distintas de la población: Centro y Sur América (~500 especies); Asia Central/Mediterráneo (250 especies) y el Este de Asia (90 especies)⁹. Numerosas plantas de este género han sido utilizadas desde tiempos antiguos en la medicina popular para curar tuberculosis, cáncer, diabetes, enfermedades coronarias, anginas de pecho e infartos al miocardio, enfermedades de la piel y tienen actividad osteogénica¹⁰, algunas de estas plantas han sido sometidas a amplias investigaciones farmacéuticas destinadas a identificar sus compuestos biológicamente activos⁴. Los antecedentes presentados por las plantas del género *Salvia*, impulsaron la investigación del aceite esencial de *Salvia occidentalis*.

Materiales y métodos

Material Vegetal. *Salvia occidentalis* (Lamiaceae) fue colectada en Septiembre de 2006, en el estado Monagas, Venezuela. La identificación de la especie fue realizada por Luis José Cumana Campos, a través de la comparación con los especímenes depositados en el Herbario IRBR de la Universidad de Oriente (UDO, Sucre, Venezuela), registrado con el N° 3145.

Obtención del aceite esencial. Las hojas frescas de *Salvia occidentalis* (48g) fueron colocadas en un equipo de destilación por arrastre con vapor. La fase de agua-aceite fue extraída con hexano; la capa orgánica se descartó por presión reducida a una temperatura de 35°C. Obteniéndose al final, 1,4mL (1,1g) de un aceite de color amarillo pálido, con un olor agradable y con un rendimiento de 2,29%.

Bioensayo con *A. salina*. La determinación del grado de toxicidad del aceite esencial de *Salvia occidentalis*, se inició con la preparación de una disolución patrón a partir de 50mg del aceite en 0,5mL de dimetilsulfóxido (DMSO), luego se agregaron 4,5mL de agua destilada. A partir de esta disolución se prepararon disoluciones de menor concentración (1000, 100, 10, 1, 0,1 y 0,01µg/mL) con agua de mar bifiltrada. Seguidamente, se agregaron a cada una de las soluciones, 10 nauplios del crustáceo *Artemia salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración se realizaron 4 réplicas, además de un control con igual número de réplicas. A las 24 horas se

determinó la mortandad de los organismos y con estos datos, se calculó la concentración letal media (CL₅₀) con la ayuda del análisis de regresión logarítmico Probit de POLO-PC (LeOra Software, 1987)^{11,12}.

Análisis de CG/FID y CG/EM. El análisis del aceite esencial de *Salvia occidentalis* fue llevado a cabo en un Cromatógrafo de Gases (CG), Hewlett Packard ,5890 A Serie II, equipado con un detector de ionización a la llama, y conectado a un integrador Hewlett Packard modelo 3926 A. Este CG/FID se encontraba equipado con la columna capilar DB-5 con una fase estacionaria fenil metil silicona (30m de longitud, 0,18mm de diámetro y 0,25µm de espesor de fase). La muestra fue disuelta en hexano (1mg.mL⁻¹) y se inyectó 1µL de la misma en modo *splitless*. La temperatura inicial fue de 60°C, durante 2min con un incremento de 2°C/min hasta 120°C. Después se realizó un segundo incremento de 15°C/min hasta 280°C mantenido por 15min.

Adicionalmente, las muestras fueron analizadas por CG/EM mediante el uso de un cromatógrafo de gases Agilent modelo 7890 A, acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (70eV) modelo 5975 C. Este equipo tenía una columna capilar DB-5 de fenil metil silicona (30m de longitud, 0,25mm de diámetro y 0,25µm de espesor de fase).

Determinación de los Índices de retención de Kováts. Se inyectaron patrones de *n*-alcanos desde C₆ (hexano) hasta C₂₅ (pentacosano), en las columnas de cada uno de los equipos utilizados, bajo las mismas condiciones de inyección de las muestras, con la finalidad de calcular los índices de retención de Kóvats. Cada índice de retención fue comparado con valores tabulados y calculados previamente de forma experimental para compuestos catalogados como típicos componentes de aceites esenciales¹³.

Resultados y discusión

La obtención del aceite esencial de *S. occidentalis*, a partir de sus hojas, se basa en el hecho de que los miembros de las hierbas aromáticas de la familia Lamiaceae poseen dos tipos de tricomas glandulares en la superficie de sus hojas, los cuales tienen la capacidad de secretar aceites esenciales¹⁴.

Los constituyentes identificados para el aceite esencial de *Salvia occidentalis*, se muestran en la Tabla I. Estos compuestos pertenecen a la familia de los terpenos. La identificación fue realizada por comparación de los índices de retención y el estudio de los diferentes patrones de fragmentación generados por los espectros de masas de cada uno de los compuestos. Según el porcentaje de área, el compuesto mayoritario fue el β-elemento, el cual ha sido

señalado como constituyente principal de aceites esenciales provenientes de plantas del género *Piper* que presentan una marcada actividad citotóxica frente a

nauplios del crustáceo *Artemia salina*¹⁵. En la Figura 2, se muestra el cromatograma de iones totales del aceite esencial, con todos los compuestos identificados.

Tabla I: Constituyentes identificados del aceite esencial de las hojas de *S. occidentalis* Sw.

Constituyentes	%Area	I.R. (Teórico)	I.R. (Experimental)
Eucaliptol	3,359	1035	1030
Alcanfor	0,641	1121	1120
4-terpinenol	0,839	1177	1175
Geraniol	2,009	1226	1220
Cimen-3-ol	1,455	1305	1300
Eugenol	5,286	1357	1357
β -Cariofileno	4,654	1440	1435
β -elemeno	20,348	1406	1405
Eudesma-4,11-dieno	5,089	1469	1461
Elemol	0,479	1549	1545
β -eudesmol	2,682	1645	1642

I.R: Índice de retención

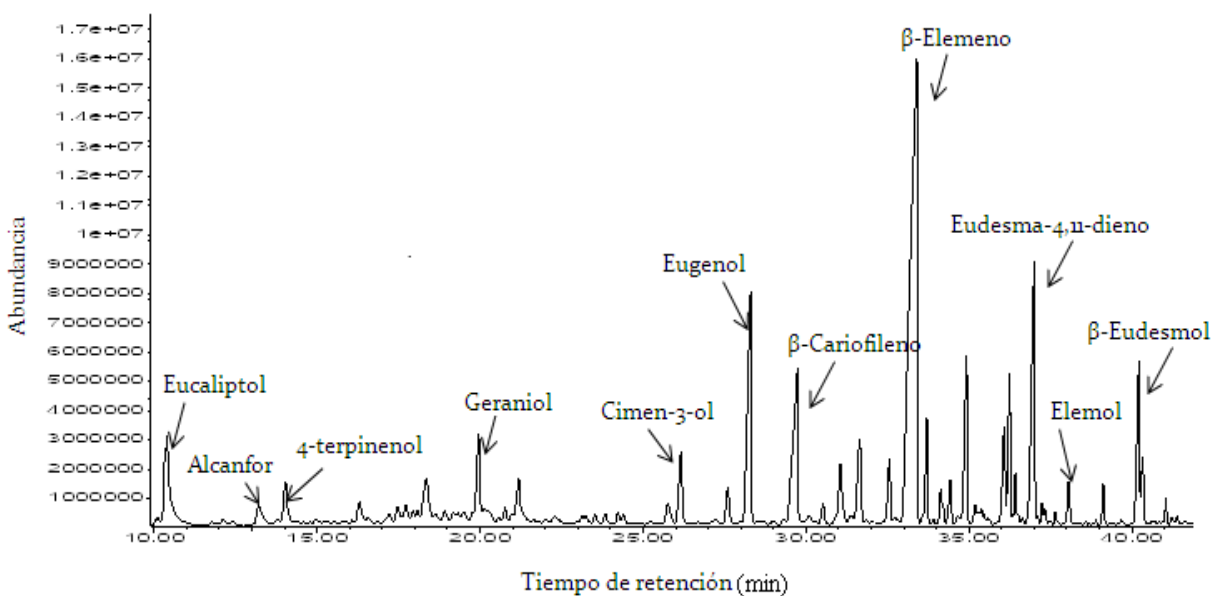


Figura 1: Cromatograma de iones totales del aceite esencial de *S. occidentalis*.

Es necesario destacar la importancia de poder clasificar el contenido de las esencias en función de los constituyentes presente en cada una y de la identidad de los mismos, ya que esto es fundamental para precisar las características organolépticas y los efectos fisiológicos o biológicos que puede tener un determinado aceite esencial.

Los resultados de la evaluación de la actividad citotóxica del aceite esencial (Tabla II) se determinaron mediante un

ensayo sobre nauplios de *Artemia salina* Linn.¹¹, lo que permite relacionar directamente el valor obtenido de CL₅₀ con la citotoxicidad, ya que existe una correlación positiva entre la décima parte del CL₅₀ contra el crustáceo y la Dosis Efectiva media (DE₅₀) frente a las células cancerosas causantes de la leucemia. Este método rápido, confiable y de bajo presupuesto¹⁷, es utilizado como vía inicial de tamizaje citotóxico de extractos para discriminar aquellas

muestras de elevada toxicidad, debido a que presenta buena correlación con la toxicidad *in vitro*^{18,19,20}. El aceite mostró una CL₅₀ de 2,60 µg.mL⁻¹ con el método Probit (límites de confianza más estrechos), lo cual indica que es un posible agente citotóxico. Una sustancia puede ser considerada como citotóxica¹¹, cuando su CL₅₀ es ≤ 30 µg.mL⁻¹. La citotoxicidad de este aceite puede atribuirse a la acción individual de uno de sus constituyentes, o al efecto sinérgico entre algunos de ellos. Ejemplo de esto es el aceite esencial de *S. pubescens* que presenta un efecto citotóxico, el cual no es atribuido únicamente a sus constituyentes mayoritarios (hidrocarburos saturados) ya que está acompañado por otros cuatro compuestos de origen terpenoidal, que pueden estar contribuyendo a dicho efecto citotóxico²⁰. En otros estudios realizados sobre las partes aéreas de *Tanacetum parthenium* (Matricaria), se demuestra que están constituidas por hidrocarburos sesquiterpénicos, pero sus extractos no poseen signos de toxicidad aguda²¹.

En nuestro caso, no se puede atribuir la actividad citotóxica que posee el aceite esencial de *Salvia occidentalis*, a todos los compuestos identificados en esta investigación, sin antes evaluar su efecto en forma individual. Este estudio constituye el primer reporte de actividad citotóxica y composición química preliminar del aceite esencial de *Salvia occidentalis*, lo cual sienta las bases para realizar investigaciones más profundas enfocadas hacia el análisis de la actividad citotóxica de cada compuesto que permitan conocer realmente cuál es el principio activo que produce dicho efecto.

Tabla II: Valores de CL₅₀ del aceite esencial de *Salvia occidentalis*

Método	CL ₅₀ (µg/ml)	Límites con 95% de confianza	
Binomial	10,00	0,01	1000,00
Moving average	3,43	0,55	22,33
Probit	2,60	0,25	19,58
Logit	2,67	0,03	365,46

Conclusión

Los resultados de esta investigación permitieron conocer la composición química del aceite esencial de *S. occidentalis*, donde los compuestos identificados se agrupaban dentro de la familia de los terpenos. El β-elemento es el constituyente principal de esta esencia, la cual presentó una marcada actividad citotóxica frente a nauplios del crustáceo *A. salina*. Es necesario establecer cuál es el principio activo responsable del efecto biológico presentado por el aceite esencial, ya que esto podría

representar una alternativa en las medidas terapéuticas para el tratamiento de las células cancerígenas.

Referencias

1. X Domínguez. Métodos de Investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México (1973).
2. F Maguna, A Romero, O Garro, N Okulik. Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Comunicaciones científicas y tecnológicas de la Universidad del Nordeste de Argentina. Resumen: E-057. Pág:1-4 (2006).
3. J Marin-Loaiza, C Céspedes. Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. **Revista Fitotecnia Mexicana**, **30(4)**, 327-351 (2007).
4. J Fernández-Alonso. Estudios en Labiatae VII. *Salvia Yukoyukparum*, Nueva Especie y Primer Representante de la Sección *Tomentellae* en Colombia. **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, **18(1)**, 38-42 (2008).
5. A Sivropoulou, C Nikolaou, E Papanikolaou, S Kokkini, T Lanaras, M Arsenakis. Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. **J. Agricultural and Food Chemistry**, **45(8)**, 3197 -3201 (1997).
6. B Tepe, D Daferera, A Sokmen, M Sokmen, M Polissiou. Antimicrobial and antioxidante activities of the Essentials oil and varius extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, **90(3)**, 333-340 (2005).
7. A Longaray, I Moschen-Pistollero, L Artico, L Atti-Serafini, S Echeverrigaray. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**, **100(2)**, 603-608 (2007).
8. M Kelen, B Tepe. Chemical composition, antioxidante and antimicrobial properties of the Essentials oils of three *Salvia* species from Turkish flora. **Bioresource Technology**, **99(10)**, 4096-4104 (2008).
9. J Walker, K Sytsma, J Treutlein, M Wink. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. **American Journal of Botany**, **91**, 1115-1125 (2004).
10. A Ulubelen, G Topcu. Chemical and Biological Investigations of *Salvia* Species Growing in Turkey. **Studies in Natural Products Chemistry**, **20**, 659-670 (1998).
11. B Meyer, N Ferrigni, J Putman, L Jacobsen, D Nichols, J McLaughling. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, **45(1)**, 31-34 (1982).
12. D Finney. Probit Analysis 3rd ed. Cambridge University Press. Londres, RU. pp. 141-173 (1971).
13. E Kováts. Gas Chromatographic Characterization of Organic Substances in the Retention Index System. **Advances in chromatography**, **271**, 213-307 (1965).

14. I Zizovic, M Stamenić, A Orlović, D Skala. Supercritical carbon dioxide Essentials oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization. **Chemical Engineering Science**, **60**, 6747-6756 (2005)
15. E Avella, J Rios-Motta. Main constituents and cytotoxic activity of the essential oil of *Piper artanthe*. **Chemistry of Natural Compounds**, **46(4)**, 651-653 (2010)..
16. V Sánchez, D Sandoval, P Herrera, M Oquendo. Alcaloides en especies cubanas del género *Croton* L. I. Estudio químico preliminar. **Revista Cubana de Farmacia**, **16**, 39-44 (1982).
17. T Roig, Plantas medicinales, aromáticas y venenosas de Cuba. Ed. Ciencia y Técnica. Instituto del Libro, La Habana, Págs. 540-1 (1965).
18. G Blasko, G Cordell. Morphinandienone alkaloids. **Heterocycles**, **27(5)**, 1269-1300 (1988).
19. I Martínez, G Quintero, L Márquez, J González, A Álvarez, A Zarragoitia. Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de *Erythroxylum confusum* Britt. mediante el Método de la *Artemia salina*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, **25(3)**, 429-431 (2006).
20. S Moreno, O Crescente, S Ortiz, M Quintero. Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. **Interciencia**, **30(10)**, 744-747 (2006).
21. L O' Neill, M Barrett, G Lewis. Extracts of feferfew inhibit mitogen-induced human peripleral blod mononuclear cell proliferation and cytokine mediate responses: a cytotoxic effect. **British Journal of Clinical Pharmacology**, **23**, 81-83 (1987).