

Composición química del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo)

Chemical composition of leaf essential oil of *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo)

PhD. Paco Fernando Noriega Rivera,^I PhD. Alexandra Guerrini,^{II} Téc. Edwin Ankuash Tsamaraint^{III}

^I Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad. Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador. Quito, Ecuador.

^{II} Departamento de Ciencias de la Vida y Biotecnología (SVeB)-LT Tierra & agua Tech UR7. Universidad de Estudios de Ferrara. Italia.

^{III} Estación Biológica Shakaim. Cantón Huamboya, Provincia de Morona. Santiago, Ecuador.

RESUMEN

Introducción: *Siparuna schimpffii* Diels, conocida vulgarmente como limoncillo, es una planta medicinal usada comúnmente por el pueblo Shuar del Ecuador por sus propiedades analgésicas.

Objetivo: determinar la composición química del aceite esencial extraído de las hojas de *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo).

Métodos: se recolectaron las hojas de *S. schimpffii* Diels. Posteriormente se obtuvo su aceite esencial, mediante destilación en corriente de vapor. Para identificar las moléculas presentes en el aceite se emplearon los métodos: GC, GC/MS, cálculo del IK, y RMN.

Resultados: fueron detectados un total de 57 componentes, en 41 de ellos fue determinada su estructura química, lo que equivale al 93,247 %. Se confirmó la estructura del componente mayoritario (germacreno D), por resonancia magnética nuclear.

Conclusiones : el aceite muestra una composición química mayoritariamente compuesta por sesquiterpenos, sobresaliendo: germacreno D 35,338 %, biciclogermacreno 8,730 %, g muuruleno 7,035 %, germacreno B 6,359 % y cadina-1(2),4-dien trans 5,161 %.

Palabras clave: *Siparuna schimpffii* Diels, aceite esencial, GC/MS, RMN.

ABSTRACT

Introduction: *Siparuna schimpffii* Diels, popularly known as *limoncillo*, is a medicinal plant commonly used by the Shuar people of Ecuador for its analgesic properties.

Objective: determine the chemical composition of the leaf essential oil of *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo).

Methods: *S. schimpffii* Diels leaves were collected. Essential oil was obtained by steam current distillation. Molecules in the oil were identified by GC, GC-MS, IK estimation and NMR.

Results: a total 57 components were found, and chemical determination of 41 of them (93.247 %) was performed. The structure of the most abundant component (germacrene D) was confirmed by nuclear magnetic resonance.

Conclusions: Sesquiterpenes predominate in the chemical composition of the oil. Among them the most outstanding are germacrene D: 35.338 %, bicyclogermacrene: 8.730 %, g muurulene: 7.035 %, germacrene B: 6.359 % and trans-cadine-1(2), 4-diene: 5.161 %.

Key words: *Siparuna schimpffii* Diels, essential oil, GC-MS, NMR.

INTRODUCCIÓN

Dentro la familia Monimiaceae del orden de las Laurales, se tienen alrededor de 34 géneros, muchos de ellos repartidos en las regiones tropicales y subtropicales de América, el género *Siparuna* es el más importante de todos con alrededor de 250 especies.¹

Siparuna schimpffii Diels es un árbol o arbusto nativo de los Andes y amazonia ecuatoriana, cuyo hábitat se comprende entre los 0-1500 msm.² Su altura varía entre 2 y 10 metros de altura y alcanza un diámetro a la altura del pecho (dbh) de al menos 10 cm; Ramitas jóvenes aplastadas en los nódulos, densamente cubiertas de pelosidades de color amarillo-marrón en propagación. Hojas opuestas; peciolos 3-8,5 (-10,5) cm de longitud; lámina de color marrón claro, marrón rojizo o verdoso, cartácea de obovada a elíptica de 18-36 x 11-18 cm, la base va de obtusa a aguda, el ápice acuminado, la punta de 1-3 cm, la superficie de las hojas son sencillas pubescentes cortas, en algunas ramificados con propagación de pelos por debajo y en las venas secundarias, el margen es doblemente dentado-serrado. Las flores frescas son de color amarillo, taza floral masculina ampliamente obconical a subgloboso, 2,5-3 mm de diámetro, 1,5-2 mm de altura, cubierto con ramas cortas simples, bifidas, o algunos pelos rectos, de vez

en cuando algunos de estos también del lado adaxial de los pétalos glabrescentes, los tépalos 4-5(-6) triangulares o redondeados, 1-12 mm de largo, el techo floral moderadamente elevado, esencialmente glabro; estambres de 10-15. Apenas exerta en la antesis. Taza floral femenina subglobosa, 2,5-3,2 mm de diámetro, 3,2 a 3,5 mm de altura. Los sépalos similares a los de las flores masculinas, el techo floral casi plano hundido alrededor del poro, el indumento similar al masculino, 15-20 estilos, apenas exerta. Frutos con receptáculos globosos, de alrededor de 1,5 a 2 cm de diámetro, con una superficie verrugosa y coronada por tépalos persistentes, de color naranja amarillento a rojo y con un olor astringente.³

En Ecuador la planta al igual que otras del género *Siparuna* toma el nombre común de limoncillo (Figura 1).



Fuente: Herbario del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad.

Fig. 1. *Siparuna schimpffii* Diels (limoncillo).

Son pocos los estudios químicos realizados en este tipo de especies. Son destacables los estudios realizados en el aceite esencial de *Siparuna thecaphora*, en donde se aprecia la presencia mayoritaria de: germacreno D, alfa y beta pineno y transcaryophylleno.⁴

En extractos de *Siparunama macrotepala* han sido identificados varios sesquiterpenos entre los que destacamos: cadaleno, calameneno, 7-hydroxy-calameneno, dimeros del 7-hydroxy-calameneno de configuración *S, S* y dos nuevos compuestos el 1-hydroxy-calameneno y el 1,6-dimethyltetrahydronaphthalenona-4.⁵

En *Siparuna pauciflora* se han detectado varios sesquiterpenos entre los que destacan el germacreno sipaucina A, el elemano sipaucina By sipaucina C.⁶

Sin lugar a dudas la especie que ha sido estudiada con mayor detenimiento es *Siparuna guianensis*. Un estudio realizado en aceites esenciales de sus hojas y frutos presenta en sus hojas como componentes mayoritarios al ácido decanoíco y al 2-undecanona; mientras que en sus frutas tenemos al 2-undecanona, b pineno y limoneno.⁷ En esta especie existen otras investigaciones en donde se describen composiciones químicas diversas como es aquella realizada en la amazonia brasileña en donde se tienen como componentes más abundantes al epi-a-cadinol, 2-udecanona y el terpinoleno.⁸

Para llegar a una determinación completa de las moléculas que componen un aceite esencial una de las técnicas más empleadas es aquella que combina la cromatografía gaseosa, comparación de índices de retención, cálculo de los índices de Kovats y la espectrometría de masas,^{9,10} que puede ser complementado con estudios de Resonancia Magnética Nuclear.¹¹

MÉTODOS

Recolección del material vegetal

La muestras fueron recolectadas en la estación biológica Shakaim, Provincia de Morona Santiago, cantón Huamboya, en el sur oriente ecuatoriano, ubicada en las siguientes coordenadas geográficas: latitud S 02° 03` 52.2", longitud W 77° 52` 32.5", altura 1200 msm. La fecha de recolección fue el 24 de febrero de 2011, una copia de la especie reposa en el herbario del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI), de la Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador, número de ejemplar 0000913.

Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial se realizó utilizando un destilador de acero inoxidable de 250 litros de capacidad, el cual funciona con el mecanismo de destilación de agua y vapor de agua. El equipo está diseñado de tal forma que tanto el agua y el material vegetal se hallan en el mismo recipiente, se separan entre sí por la presencia de una malla perforada, el agua permanece unos centímetros por debajo de la planta y el calentamiento se lo hace de forma directa.¹² El material vegetal empleado fue fresco.

Cromatografía gaseosa acoplada a masas

El aceite esencial fue analizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Se utilizó un equipo de cromatografía gaseosa marca Varian GC, con una columna Factor Four Varian VF5ms (5 %-fenil-95 %-dimetil-polisilossano; diámetro interno: 0,25 mm longitud: 30 m, film: 0.25 µm), acoplado a un espectrómetro de masas Varian MS 4000.

Las condiciones operativas fueron las siguientes:

La muestra se preparó pesando 30 mg del aceite esencial diluida en 1mL de diclorometano, el volumen de inyección fue de 1 μ L.

Gas carrier He (1 mL/min); programa de temperatura: de 55 a 100 °C a una velocidad de 1 °C/min, de 100 °C a 250 °C a una velocidad de 5 °C/min, para finalmente permanecer constante a esa temperatura por 15 minutos, la duración total del análisis es de 90 minutos. Temperatura de inyector 280 °C; Split 1/50.

Las condiciones experimentales del espectrómetro de masas fueron las siguientes: energía de ionización 70eV, corriente de emisión 10 μ A, 1 scan/seg, rango del análisis de masa 40-400 Da, temperatura de la trampa iónica 150 °C, temperatura del transfer-line 300 °C.

Para la elucidación estructural el equipo cuenta con la base de datos NIST 2001 para la comparación de espectros de masas, complementariamente se analizó los índices de retención teóricos de cada compuesto.¹³

Análisis del germacreno D aislado por RMN

El germacreno D es aislado por cromatografía en capa fina preparativa en una placa TLC 20x20 cm de gel de sílica 60F254, marca Merck; Rf = 0,80. La fase móvil utilizada fue n-hexano, tomando como antecedente la investigación realizada en separación de sesquiterpenos.¹⁴

Las condiciones del análisis RMN 1H fueron:

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Varian Gemini-400, que opera a 399,97 MHz y a una temperatura of 303 K, 4 mg de la fracción Rf 0,8 se disolvió en cloroformo deutero (0,8 mL) en un tubo de RMN de 5mm; la señal del solvente para el espectro de calibración (1H 7,26 ppm). El espectro 1H uso un estándar secuencial de pulso "s2pul".

RESULTADOS

Extracción del aceite esencial

Se obtuvo el aceite esencial con un rendimiento promedio de 0,015 %, de color amarillo tenue y olor cítrico.

Composición química del aceite esencial

El aceite esencial está compuesto mayoritariamente por hidrocarburos 91,689 %, y compuestos oxigenados 8,311 % (Figura 2). De estas moléculas un 97,218 % son sesquiterpenos y un 2,782 % monoterpenos.

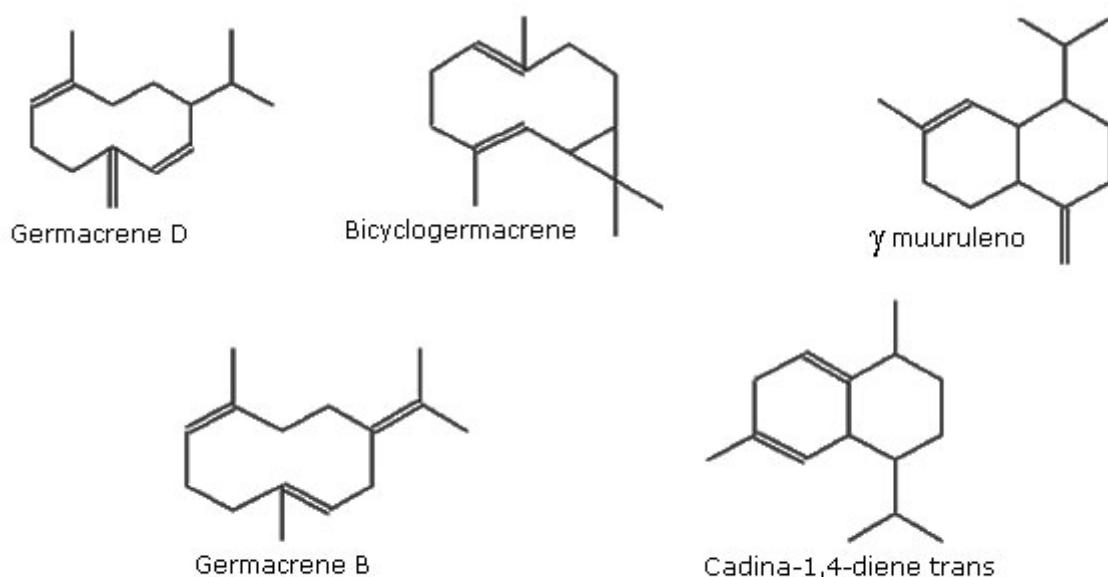


Fig. 2. Moléculas más abundantes del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels.

Los componentes más representativos son: germacreno D 35,338 %, biciclogermacreno 8,730 %, gmuuruleno 7,035 %, germacreno B 6,359 % y cadina-1(2), 4-diene trans 5,161 % (Tabla).

Tabla. Componentes del aceite esencial de hojas de *Siparuna schimpffii* Diels

^a Compuestos por orden de elución en columna DB5.^{15, 16}

^b Porcentaje de área relativa (picos relativos en función del área total de los picos)

No	TR (min)	Compuestos	Método de identificación	IK ^a	RAA % ^b
1	7,527	Thujeno	GC/MS	930	0,638
2	7,647	α-pineno		939	0,284
3	9,779	β-pineno	GC/MS	979	0,187
4	10,667	Mirceno	GC/MS	991	0,457
5	40,448	Undecanona(-2)	GC/MS	1294	1,216
6	44,315	δ-elemeno	GC/MS	1338	0,374
7	45,595	α-cubebeno	GC/MS	1351	2,028
8	47,098	Cyclosativeno	GC/MS	1371	0,231
9	47,384	α-Ylangeno	GC/MS	1375	0,289
10	47,886	Copaeno	GC/MS	1377	3,672
11	48,364	β-bourboneno	GC/MS	1388	1,782
12	48,511	β-cubebeno	GC/MS	1388	0,223

13	48,828	Iso-longilofoleno	GC/MS	1390	0,931
14	48,984	β -elemeno	GC/MS	1391	1,292
15	49,339	Nd	GC/MS		0,358
16	49,824	Nd	GC/MS		0,154
17	50,466	β -caryopylleno	GC/MS	1419	1,749
18	51,060	β -copaeno	GC/MS	1432	0,970
19	51,194	α -guaieno	GC/MS	1439	0,318
20	51,418	Nd	GC/MS		0,619
21	51,746	Nd	GC/MS		0,363
22	51,991	cis-muurola-3,5-dieno	GC/MS	1450	0,263
23	52,220	α -humuleno	GC/MS	1455	0,246
24	52,398	Nd	GC/MS		0,196
25	52,544	cis-muurola-4(14),5-dieno	GC/MS	1467	0,589
26	52,822	γ -muuruleno	GC/MS	1478	7,035
25	53,027	Nd	GC/MS		0,214
28	53,200	Nd	GC/MS		1,654
29	53,387	Germecreno D	GC/MS, RMN	1485	35,338
30	53,641	β -selenino	GC/MS	1490	0,478
31	53,747	γ -amorpheno	GC/MS	1496	1,048
32	53,927	Bycliclogermacreno	GC/MS	1500	8,730
33	54,117	α -muuroleno	GC/MS	1500	1,409
34	54,253	α -cupreno	GC/MS	1506	0,496
35	54,338	Nd	GC/MS		0,859
36	54,496	Nd	GC/MS		0,229
37	54,601	γ -cadineno	GC/MS	1514	1,614
38	54,821	Nooktatene	GC/MS	1518	5,161
39	54,941	Nd	GC/MS		0,249
40	55,280	α -cadineno	GC/MS	1539	0,285
41	55,418	α -calcoreno	GC/MS	1546	0,464
42	56,089	Germacreno B	GC/MS	1561	6,359

43	56,722	(-)-Spathulenol	GC/MS	1578	1,408
44	56,987	Viridiflorol	GC/MS	1593	0,454
45	57,239	Guaiol	GC/MS	1601	0,408
46	57,340	Nd	GC/MS		0,267
47	57,634	Nd	GC/MS		0,166
48	57,858	1,10-di-epi-cubenol	GC/MS	1619	0,182
49	58,032	1-epi-cubenol	GC/MS	1629	0,134
50	58,109	Nd	GC/MS		0,282
51	58,206	Nd	GC/MS		0,407
52	58,384	Nd	GC/MS		0,519
53	58,620	Cedrelanol	GC/MS	1640	0,693
54	58,688	tau-Muurolol	GC/MS	1642	0,660
55	58,761	α -muurolol	GC/MS	1646	0,294
56	58,986	α -cadinol	GC/MS	1654	2,862
57	60,095	Nd	GC/MS		0,217
% Total identificado					93,247

DISCUSIÓN

Los cinco componentes más abundantes encontrados en el aceite esencial de *S. schimpffii*, son sesquiterpenos no oxigenados que representan el 62 % de la totalidad del aceite.

La composición química del aceite de las hojas de *S. schimpffii* tiene cierta similitud con la de los aceites de *Siparuna thecaphora*⁴ y *Siparuna pauciflora*,⁶ sobre todo por la presencia de sesquiterpenos como el germacreno A y germacreno D, como componentes más abundantes. Con otras variedades como *Siparuna guianensis* o *Siparuna macrotepala* la química detallada en sus respectivas investigaciones difiere de la encontrada en la nuestra.^{5,7} Es importante hacer hincapié en la escasa literatura científica química existente sobre esta familia vegetal, por lo que no es posible tener muchas fuentes de comparación, a pesar que existen muchas variedades distribuidas en la región amazónica del Ecuador, posiblemente la difícil accesibilidad a estos ambientes han dejado a estas plantas y su potencial sin la posibilidad de ser investigadas.

El conocer la composición química del aceite esencial de esta planta medicinal, deja abierta la puerta para iniciar estudios de actividad biológica, considerando que la misma ya es utilizada por el pueblo ancestral Shuar como medicamento por su

actividad analgésica, estos estudios posteriores contribuirán a la valoración de la biodiversidad ecuatoriana con miras a aplicaciones farmacéuticas o cosméticas de este aceite esencial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Leitao G, Simas N, Soares S, De Brito A, Claros B, Brito T; et al. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on *Siparuna* and *Mollinedia*. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 65 (2):87-102.
2. Jorgensen, PM & S León-Yáñez. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. USA: Missouri Bot. Gard Press. 1999.
3. S-S Renner, A-E Schawazbach, L Hohmann. Siparunaceae. Flora neotropica. 1997; 95: 103-104.
4. José F-Cicció, Jorge Gómez-Laurito. Volatile constituents of the leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. Rev. biol. Trop. 2002; 50 (3-4): 963-967.
5. El-Seedi H, Ghia F, Torsell K. Cadinane sesquiterpenes from *Siparuna macrotepala*. Phytochemistry. 2001; 35(6):1495-1497.
6. Jenett-Siems K, Kraft C, Siems K, Jakupovic J, Solis P, Gupta M et al. Sipaucins A-C, sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. Phytochemistry. 2003; 63 (4): 377-381.
7. Fischer D, Limberger R, Henriques A, Moreno P. Essential oils from fruits and Leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from Southeastern Brazil. Journal of Essential Oil Research. 2005; 17 (1):101-102.
8. Viana F, Andrade-Neto M, Pouliquen Y, Uchoa D, Sobral M, De Morais S. Essential Oil of *Siparuna guianensis* Aublet from the Amazon Region of Brazil. Journal of Essential Oil Research. 2002; 14 (1):60-62.
9. Noriega P. Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. La Granja. 2009; 10(2):3-15.
10. Guerrini A, Sacchetti G, Rossi D, Paganetto G, Muzzoli M, Andreotti E, et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2009; 27(1):39-48.
11. Damiano R, Guerrini A, Maietti S, Bruni R, Paganetto G, Poli F et al. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? Food Chemistry. 2011;126 (3):837-848.
12. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1 ed: Bogotá,Colombia: CITED. 2000.

13. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. 2005; 91(4):621-632.
14. Bortolomeazzi R, Berno P, Pizzale L, Conte L. Sesquiterpene, alkene, and alkane hydrocarbons in virgin olive oils of different varieties and geographical origins . *Journal Food and Feed Chemistry*. 2001; 49 (7):3278-3283.
15. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. USA: Academic Press: 2001.
16. Adams, R-P. Identification of essential oil components by gas-chromatography. 4 ed: USA: Carol Stream II: 2009.
17. Da Silva C, Bolzan A, Mallmann C, Pozzatti P, Alves S, Heinzmann B. Sesquiterpenoids of *Senecio bonariensis* Hook. & Arn., Asteraceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010; 20(1):87-92.

Recibido: 27 de marzo de 2013.

Aprobado: 11 de febrero de 2014.

PhD. Paco Fernando Noriega Rivera. Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad. Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador. Quito, Ecuador.
Correo electrónico: pnoriega@ups.edu.ec