

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN
PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS BÁSICAS –PUICB-
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

INFORME FINAL

PROYECTO

**Aislamiento, Identificación y Cuantificación del sesquiterpenoide
hernandulcina de Orozús (*Phylla dulcis* Trev.) de Guatemala.**

Coordinador:
Juan Francisco Pérez Sabino PhD

Director del Instituto de Investigación:
Jorge Luis de León Arana PhD

Decano de la Facultad:
Oscar Manuel Cobar Pinto PhD

Investigadores:
MSc. María del Carmen Samayoa
MSc. Bessie Evelyn Oliva

Auxiliar de investigación:
Br. Max Samuel Mérida Reyes

Período del estudio: año 2009
Fecha: 08/enero/2010

INDICE GENERAL

1. Resumen	1
2. Palabras Claves	1
3. Introducción	2
4. Antecedentes	4
5. Justificación	15
6. Objetivos	16
7. Hipótesis	16
8. Metodología	17
9. Resultados	25
10. Discusión de Resultados	28
11. Conclusiones	33
12. Recomendaciones	34
13. Referencias y Bibliografía	35

Índice de Esquemas

Esquema 1	5
Esquema 2	5
Esquema 3	6
Esquema 4	6
Esquema 5	10
Esquema 6	11
Esquema 7	19
Esquema 8	20
Esquema 9	21

Índice de Tablas

Tabla 1	25
Tabla 2	25
Tabla 3	26

Índice de Cuadros

Cuadro 1	7
Cuadro 2	9
Cuadro 3	11

Índice de Figuras

Figura 1	29
Figura 2	30
Figura 3	30

1. Resumen

En el presente proyecto se investigó la sustancia sesquiterpenoide hernandulcina en la planta orozús (*Phyla dulcis* Trev.), nativa de Guatemala. La hernandulcina es un principio dulce de la planta que ha sido catalogada como 1,000 veces más dulce que la sacarosa, por lo que podría representar potencial económico y de investigación para su obtención a partir del orozús.

El material vegetal fue colectado a partir de 3 poblaciones de orozús en los departamentos de Guatemala, Zacapa y Santa Rosa. Dos colectas en cada sitio fueron realizadas durante la duración del proyecto. Las muestras fueron procesadas en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. La hernandulcina fue investigada en su contenido total en la planta y en el aceite esencial de la misma. Partiendo del material vegetal, la hernanduclina fue aislada siguiendo métodos de extracción con solvente seguidos por métodos de cromatografía clásica con la variante de la moderna cromatografía tipo Flash, y por medio de reacciones de derivatización que permitan un aislamiento cuantitativo de alto rendimiento. La hernandulcina fue analizada con detector de masas (EM) y por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno y carbono-13, con el apoyo de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil.

El aceite esencial fue obtenido por la técnica de extracción-destilación y posteriormente analizado con detector de masas (EM) para verificar la presencia de hernandulcina en el aceite y su posible descomposición en la extracción-destilación.

Se obtuvo información valiosa sobre el contenido de hernandulcina en el orozús guatemalteco, que permitirá la evaluación del potencial económico de la sustancia y su obtención en forma pura para la investigación de su actividad biológica. Se determinó también la metodología de aislamiento y derivatización que podrá ser utilizada para el estudio de los productos naturales en Guatemala.

2. Palabras claves:

Aislamiento, Cromatografía, Derivatización, Espectrometría de masas, Hernandulcina, Orozús, Resonancia Magnética Nuclear.

3. Introducción

Uno de los principales problemas para lograr el aprovechamiento sostenible de los recursos naturales de Guatemala es la falta de conocimiento científica de los recursos de manera que puedan ser evaluadas sus aplicaciones y uso sostenible. En la flora guatemalteca existe una amplia variedad de plantas utilizadas en la medicina tradicional y que presentan un potencial económico que no está siendo aprovechado. Varios esfuerzos han realizado en los últimos años la Dirección General de Investigación y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para financiar investigaciones que generen conocimiento sobre los recursos naturales de Guatemala. Esto ha permitido que haya un inicio en el proceso de investigación de los productos naturales de la flora guatemalteca. Esta investigación es aún incipiente debido a la falta de equipo y metodología para llegar a la cuantificación y elucidación estructural de moléculas con aplicaciones potenciales en las industrias de alimentos y farmacéutica.

En la actualidad existe una crisis económica a nivel nacional y mundial que obliga a buscar alternativas para contribuir al desarrollo económico de Guatemala. Una de esas alternativas debería ser el aprovechamiento sostenible del recurso flora a través de la generación de valor agregado por medio de la investigación de los productos naturales y sus posibles aplicaciones. Entre las plantas que presentan potencial para la investigación, se encuentra el orozú (*P. dulcis*) por poseer un principio dulce, la sustancia sesquiterpenoide hernandulcina, la cual ha sido catalogada como 1,000 veces más dulce que la sacarosa. Diferentes estudios han sido realizados sobre el aceite esencial de esta planta en Guatemala, sin embargo, no se ha realizado investigación orientada a la identificación de esta sustancia en el orozú que crece en Guatemala. La hernandulcina podría presentar potencial para uso como edulcorante y para la investigación de su actividad biológica.

Resultados diferentes fueron obtenidos en estudios sobre la planta realizados en México y Puerto Rico. En México no fue encontrada la hernandulcina en el aceite esencial de *P. dulcis* extraído por hidrodestilación, mientras que en Puerto Rico fue encontrada la hernandulcina en alta proporción en el extracto diclorometánico de la planta, sugiriéndose que posiblemente existen dos quimiotipos para esa planta (SoutoBachiller *et al*, 1997). La hernandulcina presenta dificultades para su análisis por cromatografía de gases ya que es una sustancia con poca volatilidad y termolábil. Por esa razón, en este proyecto se planteó la aplicación de metodología para el aislamiento y análisis de la sustancia, que incluye tres diferentes métodos para la derivatización de la molécula, que permita su aislamiento y lograr una mayor volatilidad y estabilidad para su análisis cromatográfico.

La química puede ser una herramienta de desarrollo en Guatemala, ya que a través de la misma puede lograrse la generación de valor agregado para recursos naturales que se encuentran en abundancia en el país y que no son comercializados o se comercializan a un precio muy bajo, por la falta de

conocimiento de su potencial. El costo de oportunidad de no contar con una información más completa sobre las plantas nativas, repercute en las comunidades de los departamentos con mayor pobreza, que podrían contar con dichas plantas como fuente alternativa de ingresos económicos.

4. Antecedentes

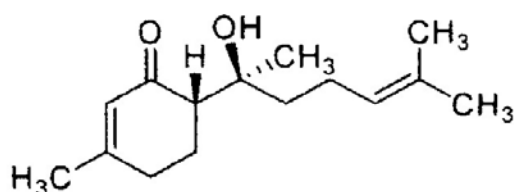
4.1 La hernandulcina

La (6S, 1'S)-(+)-hernandulcina (Esquema 1) es reconocida como el principio dulce de la planta *Phylla dulcis*, Verbenaceae, antes conocida como *Lippia dulcis*. El nombre de la molécula fue dado en honor al conquistador español Francisco Hernández, quien escribió una monografía titulada “*Historia Natural de la Nueva España*”, entre 1570 e 1576, en la cual describía una planta intensamente dulce conocida con el nombre azteca de Tzompelic xihuitl, que significa “hierba dulce” y que es la planta actualmente conocida como “orozús” o *P. Dulcis* (Compadre *et al.*, 1985). El compuesto, es un sesquiterpeno tipo bisabolano aislado por primera vez de las hojas y flores de la planta *P. Dulcis* en México. Fue catalogada como 1000 veces más dulce que la sacarosa bajo una base molar, en ensayos de expertos (Kaneda, 1992). La forma racémica del compuesto ha sido sintetizada por condensación aldólica partiendo de dos cetonas comercialmente disponibles, la 6-metil-5-hepten-2-ona y la 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (Esquema 2), que son también sus productos de degradación térmica. La (+-)-hernandulcina no es tóxica para ratones em dosis simples de hasta 2 g/kg de masa corporal (Kaneda, 1992).

La hernandulcina ha sido descrita en el aceite esencial de *P. Dulcis* de México. Estudios posteriores en México, indicaron que la hernandulcina no fue encontrada en el aceite esencial de *P. Dulcis*, mientras que el monoterpenoide alcanfor fue el componente principal. En Puerto Rico, la hernandulcina fue encontrada como el componente principal de extractos de diclorometano de la planta *P. Dulcis*. En el análisis del aceite esencial de *P. dulcis* de plantas de Guatemala, no había sido encontrada la hernandulcina, mientras que las cetonas 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, productos de la degradación térmica, fueron encontradas en concentraciones importantes (Jayes, 2007) (Cuadro 2). Esto indicaría que la hernandulcina podría estar presente en las plantas de Guatemala, y que podría estar siendo degradada en el proceso de extracción del aceite esencial (hidrodestilación con aparato tipo Clevenger) o en la inyección del aceite esencial en el sistema de CG-EM (260°C), ya que la degradación ocurre a 140°C. Recientemente, en una muestra de aceite esencial de *P. dulcis* de Guatemala analizado por CG-EM, fue encontrada la hernandulcina (Pérez, 2008). Sin embargo, no fue posible cuantificarla en vista de la descomposición de la misma en el proceso analítico por la alta temperatura, observándose elevados porcentajes de sus productos de degradación 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona. El espectro de masas de la sustancia obtenido en dicho experimento se presenta en el esquema 3 así como el patrón de fragmentación de masas (esquema 4). En el espectro pueden observarse los picos de la eliminación de agua en 218 m/z, su posterior fragmentación (137m/z), y otros picos importantes en la identificación de la sustancia (153, 110, 95, 82 e 69 m/z). (Pérez, 2008).

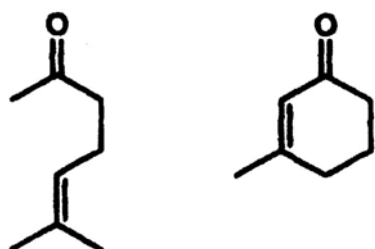
Esta es a razón principal para la preparación de este proyecto, para identificar y cuantificar la hernandulcina, en *P. dulcis* de Guatemala, como una molécula de

interés estratégico, en vista que presenta un sabor dulce intenso que podría ser un sustituto potencial de los azúcares existentes en el mercado. Los métodos de aislamiento y derivatización propuestos en este proyecto se basan en trabajos previos con hernandulcina y con moléculas con estructura análoga, como as α -lactonas α , α -insaturadas (Lima *et al.*, 1985).

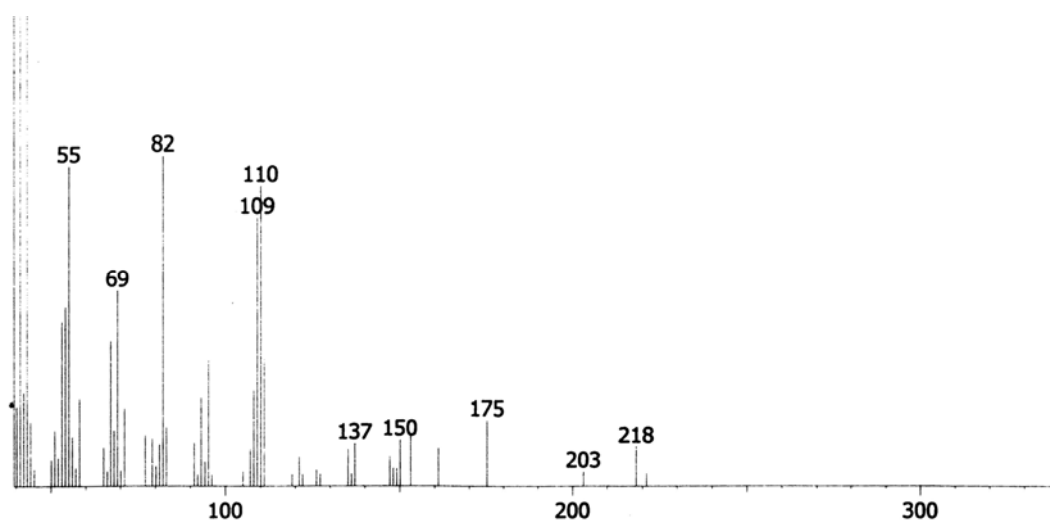


(6S,1'S)-(+)-Hernandulcin (**1**)

Esquema 1. Hernandulcina.

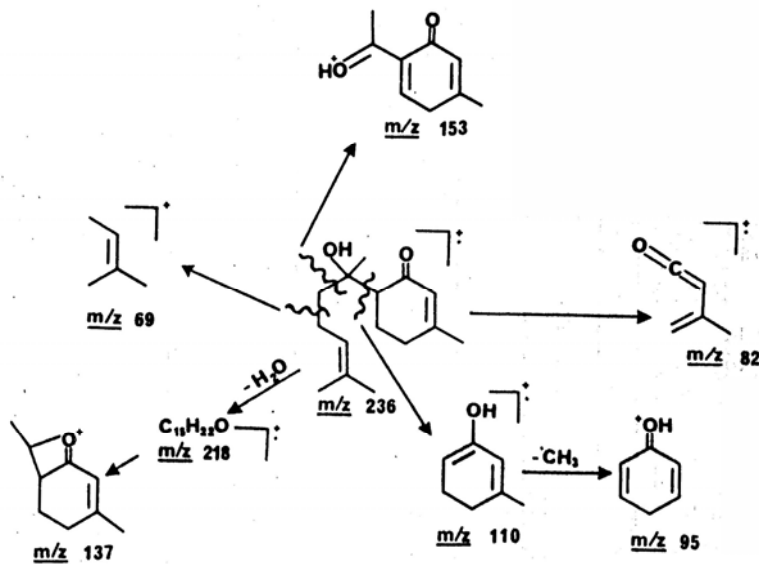


Esquema 2. 6-metil-5-hepten-2-ona e 3-metil-2-ciclohexen-1-ona



FRAN1405.D03

Esquema 3. Espectro de masas de hernandulcina obtenido del análisis por DG-EM del aceite esencial de orozús de Guatemala (Pérez, 2008)



Esquema 4. Patrón de fragmentación de la hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

4.2 *Phyla dulcis* Trev.

P. dulcis (Verbenaceae), antes conocida como *Lippia dulcis*, crece en suelos de bosques, márgenes de pantanos, o en pastos, desde el nivel del mar hasta 1800 msnm. La planta se encuentra en Guatemala, México y Honduras Británica hasta a Colombia (Standley e Steyermark, 1970). *P. dulcis* es una planta perenne, no mayor de 40 cm. Las hojas de 1-6 cm de largo, son muy aromáticas. Cuando es masticada, la raíz presenta sabor de licor, por lo cual es conocida como “orozús” en Centro América (Souto-Bachiller *et al.*, 1997). *P. dulcis* es usada para el tratamiento de tos, bronquitis e retención urinaria. En México es usada también como emenagogo y para abortos.

4.3 Estudios de *Phyla dulcis*:

En el estudio de Souto-Bachiller *et al* (1997), con *P. dulcis* de Puerto Rico, fue encontrado que *P. dulcis* presentaba alta proporción de sesquiterpenoides (79%), siendo los principales: el sesquiterpenoide intensamente dulce (+)-hernandulcina (36%) y su epímero (-)-epi-hernandulcina (22%). En ese estudio no fue encontrado alcanfor (<<0.01%). En un trabajo previo en México, *P. dulcis*, presentó solo cantidades traza de hernandulcina (40 ppm peso/peso seco), mientras que el aceite esencial aislado por destilación, presentó principalmente monoterpenoides (86%), con alcanfor como principal componente (53%). Es importante mencionar que Souto-Bachiller y colaboradores, aislaron la hernandulcina partiendo de extractos con solventes orgánicos, analizando

después la molécula por CG-EM, experimentando dificultades que se describen en sección dificultades analíticas. En México, la hernandulcina no fue detectada en el aceite esencial extraído por hidrodestilación, en el análisis por CG-EM. Souto-Bachiller y colaboradores sugieren que posiblemente la planta analizada en México no era *P. dulcis* o en otro caso, correspondía a otro quimiotipo de la misma especie. El Cuadro 1 presenta los resultados relevantes sobre la composición del aceite esencial de *P. Dulcis* obtenidos en México y en Puerto Rico. La metodología de extracción diferente también podría ser una causa para no haber encontrado la hernandulcina en la planta de México.

Cuadro 1

Resultados previos de hernandulcina en aceite esencial de *P. dulcis*

Sustancia	México	Puerto Rico
Alcanfor	53.24	0.00
Canfeno	15.99	0.12
(+)-hernandulcina	0.00	36.00
(-)-epi-hernandulcina	0.00	22.00

Kaneda *et al.* (1992), identificaron un nuevo sesquiterpeno dulce, de las flores y hojas de *P. dulcis* colectadas en Panamá, la (+)-4-beta-hidroxihernandulcina, que fue aislada con (+)-hernandulcina, (-)-epihernandulcina, y 6-metil-5-hepten-2-ona. Acteoside (verbascosideo), un glicosído fenilpropanoide fue aislado de las flores de *P. dulcis*. La estructura de la (+)-4-beta-hidroxihernandulcina fue establecida por la interpretación de los datos espectrales. Cáceres (1998) indica que la composición del aceite esencial de *P. dulcis* de Guatemala, presenta los componentes principales: lipiol, monoterpenos (alcanfor, borneol, canfeno, limoneno, linalol, mirceno, α - e β -pineno, terpinoleno, α -terpineol); sesquiterpenos: α -cadineno, 6-metil-5-hepten-2-ona, α -copaeno, α -cariofileno y otros desconocidos), no mencionando la hernandulcina.

El análisis del aceite esencial de *P. dulcis* de una población de Guatemala, colectada en tres meses de 2006, mostró resultados donde los componentes principales fueron 6-metil-5-hepten-2-ona (18.8-21.4%), 3-metil-2-ciclohexen-1-ona (9.6-11.1%) e α -bisabolol (8.0-14.6%), no siendo encontrada la hernandulcina (Cuadro 2). El rendimiento de extracción del aceite por hidrodestilación fue de 0.54% (abril), 0.50% (junio) e 0.60% (octubre). Las cetonas 6-metil-5-hepten-2-ona y 3-metil-2-ciclohexen-1-ona, son los fragmentos térmicos de la hernandulcina, por lo cual es interesante aislar y cuantificar la hernandulcina en plantas de Guatemala (Jayes *et al.*, 2008).

4.4 Dificultades del análisis de hernandulcina por CG-EM

Souto-Bachiller *et al.* (1997), encontraron que las condiciones utilizadas en México para el análisis de hernandulcina no eran adecuadas, ya que la molécula es relativamente no volátil y térmicamente degradable. Los autores utilizaron

inicialmente las condiciones publicadas por Kinghorn y colaboradores, que consistían en la aplicación de temperaturas de inyección bajas (70-80°C) para preservar la hernandulcina térmicamente sensible y usando división de flujos en relación 17:1 para concentrar la muestra. Los autores utilizaron un inserto de división típico, en el puerto de inyección. Las muestras de aceite fueron analizadas usando columnas HP Ultra de 25 m y SPB5 Supelco de 60 m, con división de flujos de 40:1 e 15:1 respectivamente. La rampa de temperatura fue establecida desde 35°C (4 min) hasta 300°C (4°C/min). Esas condiciones no fueron satisfactorias para el análisis de la hernandulcina, ya que la hernandulcina no se evaporaba completamente.

Cuadro 2.

Composición del aceite esencial de *P. dulcis* de Guatemala (% de área).

Substancia	04/06	06/06	10/06
6-metil-5-hepten-2-ona	19.6	21.4	18.8
3-metil-2-ciclohexen-1-ona	10.7	11.1	9.6
copaeno	3.4	6.7	4.8
cariofileno	6.1	7.6	7.5
farneseno	4.9	5.2	6.0
Germacreno D	2.7	1.1	3.4
Biciclogermacreno	4.8	2.1	5.7
cadineno	5.4	5.3	5.6
Espatulenol	2.4	5.1	2.3
bisabolol	14.6	8.0	11.9

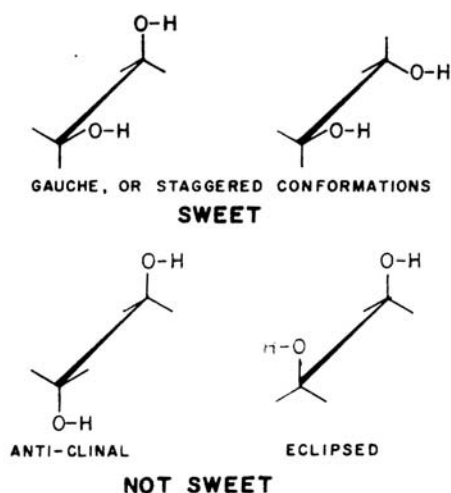
Souto-Bachiller *et al.* (1997) lograron mejores resultados, utilizando un inserto menor (1.3 mm d.i., 140 μ L) con capacidad para transferir la muestra a la columna muy rápidamente usando pequeñas cantidades (0.1-0.2 μ L). Así, la muestra fue vaporizada en el inyector a alta temperatura (220°C) y transferida directamente a la columna durante el tiempo isotérmico (30-60s). Para mejorar la eficiencia de la columna la muestra fue reconcentrada en la cabeza de la columna antes de la separación siendo fijada la temperatura inicial a 60-70°C por 2-4 min para alcanzar un mejor efecto de solvente, con lo cual se logró la transferencia cuantitativa de la muestra en 30 s.

En el presente proyecto se pretende mejorar el procedimiento de identificación y cuantificación de la hernandulcina, utilizando técnicas de derivatización para mejorar a detección de la molécula.

4.5 Teoría Molecular del sabor dulce:

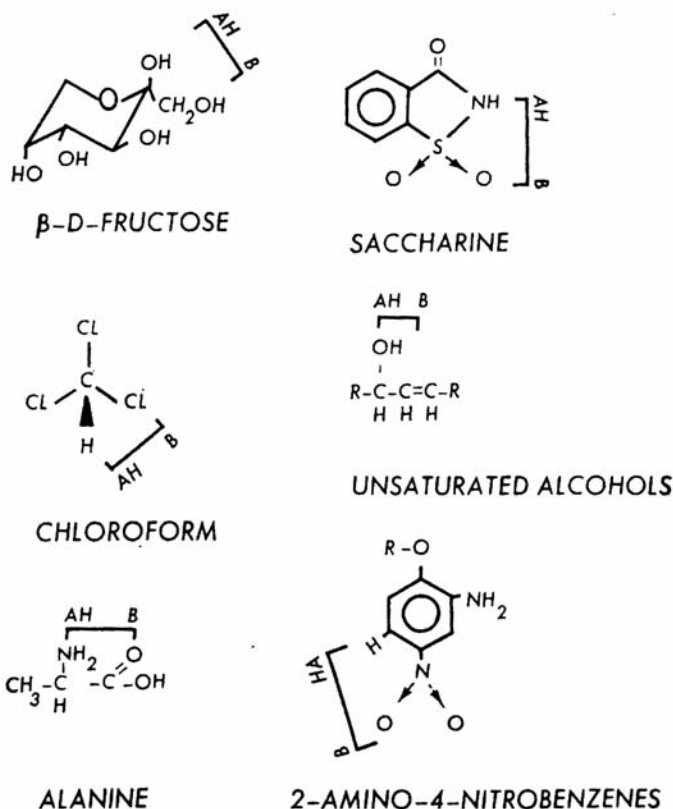
Shallenberger y Acree describieron la teoría del sabor dulce en 1967 (Shallenberger y Acree, 1967). Según esa teoría, el grupo glicol es la unidad dulce de los azúcares y la intensidad del sabor dulce varía inversamente con el grado en el cual los grupos OH-glicol están enlazados intramolecularmente por enlaces de hidrógeno. Los grupos OH vecinos en la unidad glicol necesitan estar orientados aproximadamente en conformación "gauche", o estar en conformación alterna. Los grupos OH vecinos que están en conformación anti aparentemente están muy separados para causar sabor dulce. Los grupos OH glicol que se encuentran eclipsados probablemente participan en un enlace de hidrógeno intramolecular que inhibe competitivamente la interacción del glicol con el sitio receptor.

Estas características estéricas de las unidades de azúcar dulce y no dulce se muestran en perspectiva en el Esquema 5. Los parámetros conformacionales del glicol y su conformación gruesa de anillos de piranosa y furanosa han sido utilizados para explicar a la variación en la intensidad del sabor dulce de los azúcares. El mecanismo primario de la respuesta del sabor dulce es el enlace de hidrógeno intermolecular entre la unidad glicol y el sitio receptor de sabor. La unidad dulce de los azúcares, que es la unidad glicol, puede ser catalogada como una entidad bifuncional con un componente *AH* y otro *B*.



Esquema 5. Representación de los grupos OH glicol (Shallenberger e Acree, 1967)

Así, se reconoce una característica común en muchas sustancias que presentan sabor dulce. En el sistema *AH,B*, *A* y *B* son átomos electronegativos separados por una distancia mayor que 2.5 Angstroms (*A* en este trabajo), aunque menor que 4 *A*. *H* es un átomo de hidrógeno enlazado a uno de los átomos electronegativos por un enlace covalente. Así, las sustancias de sabor dulce deben tener un protón ligeramente ácido a una distancia específica de un orbital electronegativo. Normalmente *A* y *B* son oxígeno o nitrógeno, pero en algunos casos uno de ellos podría ser un átomo de carbono o cloro o un centro de insaturación. *AH* es un donador de protones y *B* es un aceptor de protones. Ejemplos de sustancias con sabor dulce son mostrados en el Esquema 6. Las características que confieren el sabor dulce a esas moléculas son resumidas en el Cuadro 3.



Esquema 6. Algunas sustancias dulces (Shallenberger y Acree, 1967).

Cuadro 3.

Distancias interatómicas de sistemas AH, B en compuestos dulces representativos (Shallenberger y Acree, 1967)

Table 1. INTERATOMIC DISTANCES OF AH, B SYSTEMS IN REPRESENTATIVE SWEET COMPOUNDS

Compound	AH	B	A-B distance (Å)	AH proton-B orbital distance (Å)
β -D-Fructopyranose	-OH	-O-	3.5	2.4
Saccharine	NH	-O	2.5	3.0
Chloroform	-CH	-Cl	1.9	2.8-3.2
1-Octene-3-ol (unsaturated alcohol)	-OH	H H -C=C-	3.0	2.4
Alanine	-NH ₃ ⁺	-COO-	3.0	2.4
1-Propoxy-2-amino-4-nitrobenzene	ArH	-O	2.7	-

En el caso de la hernandulcina, dos posibles sitios de enlace son los grupos carbonilo C-1 e hidroxilo C-1' (ver esquema 1), debido a que el sabor dulce de la sustancia es perdido cuando estos grupos son modificados. Ya que estos dos grupos funcionales están localizados a 2.6 Å en la conformación principal, la

molécula encaja en el modelo de Shallenberger para sustancias dulces, por lo que esto explicaría el sabor intensamente dulce de esta molécula.

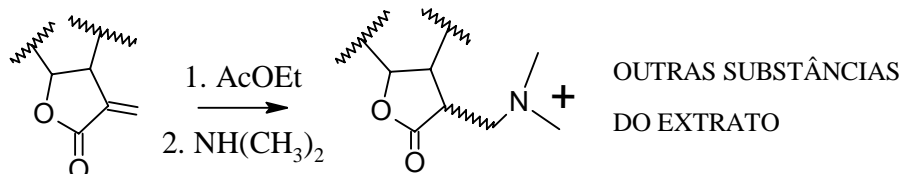
4.6 Metodología utilizada para el aislamiento de α -lactonas sesquiterpénicas-metilénicas

Lima (1983), desarrolló metodología para el aislamiento de α -lactonas sesquiterpénicas α -metilénicas de *Vallinosmopsis erytiropappa* Sch.-Bip. utilizando adición de dimetilamina a los extractos de la planta. Estas lactonas presentan interés por mostrar actividad biológica, además de la importancia para la quimiosistemática de la familia de las compuestas.

Diferentes lactonas α -metilénicas han presentado actividad biológica antitumoral, alergénica, esquistosomicida, antiinflamatoria, inhibidora del crecimiento de plantas, antimicrobiana, fungicida y tóxica (Lima, 1983). En cuanto a la importancia en la quimiosistemática de estos compuestos, estas lactonas presentan tres diferentes niveles de complejidad, los cuales pueden ser utilizados para clasificar las diferentes especies por orden evolutivo.

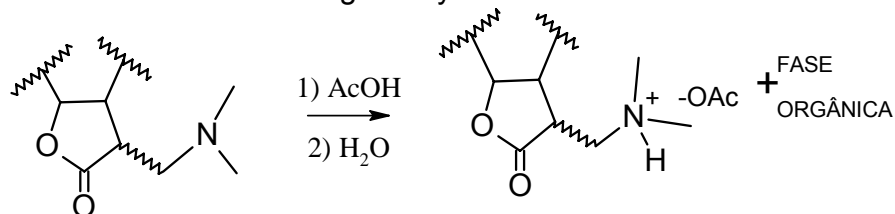
El método desarrollado por Lima, consiste en la derivatización reversible de los grupos metilénicos terminales, protegiendo los grupos metilénicos y con posterior formación de una sal, para aislar las lactonas de los extractos hexánicos de la planta, y la posterior recuperación del grupo metilénico exocíclico de las α -lactonas. El método se basa en la sensibilidad del enlace doble a la adición por nucleófilos. El método es descrito a continuación (Lima, 1983):

1) Adición de dimetilamina a una alícuota del extracto disuelto en acetato de etilo:



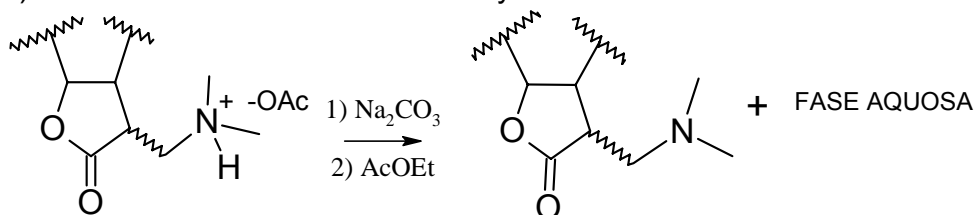
EXTRATO

2) Adición de ácido acético glacial y extracción de las sales solubles en agua:

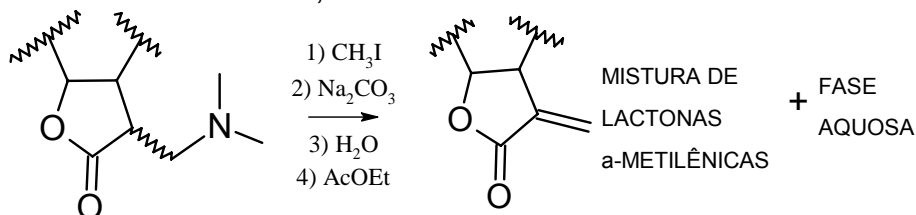


+ OUTRAS SUBSTÂNCIAS DO SUBSTRATO

3) Neutralización de la fase acuosa y extracción con acetato de etilo



4) Adición de yoduro de metilo para formar una sal de amonio cuaternaria. Adición de solución básica. Separación de las fases para obtención de una mezcla de lactonas α -metilénicas,



5) separación e identificación de las lactonas α -metilénicas presentes en la mezcla.

El estudio de Lima es interesante por la analogía estructural con la hernandulcina, sustancia que posee una insaturación en alfa, en relación a un grupo cetónico, por lo cual el método es considerado en la propuesta de aislamiento de la hernandulcina.

4.7 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son usados en muchas ramas de la industria para proporcionar aromas y olores especiales a productos como perfumes, cosméticos, jabones, condimentos, dulces. Otros usos consisten en enmascarar olores desagradables en ambientes de trabajo e instalaciones sanitarias, así como su uso como solventes y como insumos en productos de las industrias de plásticos, tintas, caucho, insecticidas y otras. Los aceites esenciales son la mezcla de sustancias volátiles obtenidas por arrastre con vapor de agua. En general el término fracción volátil es usado para definir una mezcla de compuestos volátiles que pueden recuperarse debido a sus características de evaporación espontánea y /o a través de técnicas disponibles. La fracción volátil es de esta forma un marco que abarca los extractos de headspace, aceites esenciales, sabores, fragancias, aromas y extractos obtenidos por técnicas específicas (Bicchi *et al.*, 2006).

Muchos aceites constituyen compuestos de partida para síntesis de otras sustancias útiles en las industrias química y farmacéutica. Otros componentes tienen propiedades farmacológicas y son usados como antibacterianos,

analgésicos, sedantes, expectorantes, estimulantes y estomáquicos en la composición de medicamentos.

Para que un aceite esencial nuevo sea introducido en el mercado internacional, presenta diferentes niveles de dificultad, según la industria para la que se destine, así por ejemplo, para su aceptación en la industria de aromas debe cumplir con patrones complejos y rígidos, exigiendo una calidad uniforme. Por esta razón, generalmente existe un gran interés en esta industria por la investigación de nuevas fuentes de aceites esenciales. En el caso de la industria química, en la cual los aceites esenciales son utilizados como solventes, o bien, como insumos, la aceptación del nuevo producto no presenta las mismas restricciones.

Aragão *et al* (1981), seleccionaron varias plantas con posibilidades económicas en cuanto a su cultivo, basándose en los siguientes criterios:

- a) abundancia de la planta en la región
- b) rendimiento de aceite esencial elevado, igual o mayor que 0.5%
- c) un componente principal económicamente importante en concentración superior a 30%
- d) un componente secundario de alto valor económico

En dicho estudio, Aragón obtuvo resultados de análisis químico de 82 Aceites esenciales de plantas del Noreste de Brasil, de 14 familias botánicas diferentes. Los resultados más importantes de dicho estudio fueron los cromatogramas correspondientes a cada aceite y la relación de los constituyentes químicos identificados, así como sus fuentes alternativas. Previo a su análisis, los aceites estudiados fueron obtenidos extracción por arrastre con vapor de agua, a partir de materiales colectados en el campo y transportados al laboratorio en vehículo, manteniéndolas a baja temperatura. Existen otras técnicas de extracción antiguas, como la extracción con grasa fría o grasa caliente, que no serán utilizadas en el proyecto, al ser de bajo rendimiento (Guenther, 1948). Como aporte final, el autor presentó once monografías de los aceites esenciales seleccionados por la importancia de sus posibilidades económicas, en las cuales se hicieron sugerencias sobre la necesidad de investigación agronómica para su aprovechamiento agroindustrial en el noreste de Brasil.

En cuanto a las técnicas de extracción, las más conocidas son el arrastre con vapor de agua, la hidrodestilación y la extracción con solventes. Para propósitos analíticos es la hidrodestilación con aparato tipo Clevenger la más utilizada (Pereira, *et al*, 2000), sin embargo, esta técnica provoca reacciones de oxidación en varios componentes del aceite esencial, debido a la presencia de agua y la alta temperatura, por lo que la composición del aceite se altera antes del análisis cromatográfico. Por esta razón, se ha utilizado recientemente la técnica de destilación-extracción por tres horas, utilizando el aparato de Likens-Nickerson, para la extracción del aceite con fines puramente analíticos (Pereira *et al.*, 2003).

5. Justificación del estudio

La hernandulcina puede representar una alternativa para el uso como edulcorante natural, por lo cual se considera como un producto natural con interés estratégico, ya que ha sido clasificada como 1,000 veces más dulce que la sacarosa, además que se han realizado experimentos para su síntesis. Es importante conocer el contenido de hernandulcina en la planta orozú (*P. dulcis*) de Guatemala, ya que es una planta de crecimiento muy rápido y perenne, por lo que podría presentar potencial económico para la producción de ese sesquiterpenoide, para su uso como edulcorante y para la investigación de su actividad biológica en forma pura.

Existen dificultades para el análisis de la hernandulcina por cromatografía de gases, por lo que es importante establecer métodos que puedan facilitar el análisis cuantitativo en el material vegetal. La derivatización de la molécula posteriormente al aislamiento es una alternativa importante, ya que pueden ser aplicados diferentes métodos, como la utilización de anhídrido trifluoroacético, y la acetilación y reducción de la hernandulcina con estimación de buenos rendimientos. Es importante por lo tanto, comparar los dos métodos de aislamiento así como los tres métodos de derivatización propuestos, para evaluar la eficiencia en la cuantificación de la hernandulcina en orozú. La aplicación de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno y de carbono-13, con el apoyo de la Universidad Federal de Río de Janeiro, permitió confirmar la identidad de la sustancia aislada.

Por otra parte, la química es una ciencia cuyo desarrollo en Guatemala representa un enorme potencial para contribuir a la elevación del nivel de vida de la sociedad guatemalteca. Es necesario un enfoque científico para la investigación y solución de problemas relacionados con el aprovechamiento racional de los recursos naturales y la química puede ser una herramienta para esos fines. En este proyecto, se adaptará y desarrollará metodología para el aislamiento y análisis de productos naturales, que podrán ser aplicados posteriormente para la investigación de otros principios activos de las plantas nativas de Guatemala. Las técnicas de derivatización propuestas permitirán también analizar formas más económicas para la obtención de la hernandulcina en forma pura, en mayor escala.

6. Objetivos

6.1 General

Evaluar el potencial del contenido de hernandulcina de la planta *Phyla dulcis* de diferentes poblaciones de Guatemala, para sus posibles usos como edulcorante e investigación de actividad biológica.

6.2 Específicos

Determinar la concentración de hernandulcina en material vegetal de la planta *P. dulcis* de cinco poblaciones de la planta en Guatemala.

Aislar la hernandulcina y posibles isómeros de *P. dulcis* de Guatemala e identificarla por técnicas cromatográficas, espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear.

Determinar la hernandulcina en el aceite esencial de *P. dulcis* extraído por hidrodestilación y por extracción-destilación simultáneas.

Comparar el contenido de hernandulcina en *P. dulcis* de diferentes poblaciones de Guatemala.

Desarrollar metodología de aislamiento y derivatización para la obtención de hernandulcina de alta pureza y su análisis por Cromatografía de Gases y Resonancia Magnética Nuclear.

Elucidar la estructura de otras moléculas que puedan ser aisladas a partir de los extractos de cromatografía Flash de *P. dulcis*, por Espectrometría de Masas y Resonancia Magnética Nuclear.

7. Hipótesis (si procede)

La planta *P. dulcis* de Guatemala contiene hernandulcina en concentraciones que permiten su aislamiento y su caracterización por técnicas cromatográficas y de Resonancia Magnética Nuclear.

8. Metodología

8.1 Colecta

Con base en la información de la Flora Guatemalteca, se realizarán viajes de campo para la localización de *P. dulcis*. Se buscarán por lo menos cinco procedencias distintas, contándose a la fecha con dos poblaciones localizadas en Barberena y en la ciudad de Guatemala. Se realizarán dos colectas en cada población durante el desarrollo del proyecto. Dos ejemplares de cada población serán colectados para ser herborizados, depositándose una en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. A cada muestra se le asignará un código, iniciando por dos letras que identifiquen la localidad seguido de seis dígitos correspondientes a la fecha de muestreo. Se realizará una lectura con un sistema de posicionamiento geográfico (GPS) para referenciar el lugar de colecta. Se colectará por lo menos 1 Kg de partes aéreas en cada población de la planta y el material será transportado a la ciudad de Guatemala para su procesamiento.

8.2 Preparación de la muestra:

Las hojas y troncos suaves del material vegetal serán separados y el resto será eliminado. Luego, el material vegetal será mezclado y secado a temperatura ambiente, dejando una fracción de 25 g para determinaciones de humedad. Dos ejemplares serán herborizados para depositar en herbario.

Una mitad de cada muestra será separada para el aislamiento de la hennandulcina.

La otra mitad de la muestra será dividida en tres submuestras de masa aproximadamente igual.

A partir de cada submuestra serán realizadas las determinaciones que se explican a continuación.

8.3 Determinación de Humedad:

Pesar con exactitud 10.00 g de material vegetal recién cortado (submuestra 1) y colocarla en una cápsula de porcelana.

Colocar la muestra en el horno de convección y dejarla a 95°C por 20 h.

Pesar la muestra en balanza analítica, determinando el contenido de humedad por diferencia con el peso original.

8.4 Determinación de contenido de cenizas:

Pesar con exactitud en una balanza analítica, 4 g de material vegetal húmedo en un crisol de porcelana.

Calcinar la muestra en una mufla a 550°C por 14 horas, o hasta obtener cenizas blancas.

Pesar las cenizas en balanza analítica luego de la calcinación.

Obtener el contenido de cenizas, relacionando el peso de las cenizas con el peso

original de la muestra.

8.5 Aislamiento de la hernandulcina

8.5.1 Método de Souto-Bachiller *et al.* (1997)

- 1) 10 g de planta seca y molida son extraídos en aparato Soxhlet con pentano (100 mL) por 4 h. Hacer una segunda extracción con CH_2Cl_2 .
- 2) Concentrar los extractos en rotavapor
- 3) Disolver los residuos en 1-3 mL de cloroformo
- 4) Separar a hernandulcina por CCD preparativa usando hexano- Me_2CO (17:3)
- 5) R_f hernandulcina = 0.5

8.5.2 Propuesta de aislamiento de la hernandulcina por formación de sales cuaternarias con dimetilamina:

- 1) Extraer 20 g de hojas secas y molidas de *P. dulcis*, con hexano.
- 2) Extraer posteriormente el material vegetal residual de con etanol
- 3) Extraer el extracto etanólico con hexano formando así el extracto hexánico del etanólico.
- 4) Aplicar separadamente el proceso selectivo de aislamiento a los extractos hexánico y hexánico del etanólico.
- 5) Concentrar los extractos hexánicos y disolver en acetato de etilo.
- 6) Adicionar dimetilamina en exceso para formación de los productos de adición a la insaturación en alfa.
- 7) Extraer el exceso de dimetilamina con agua.
- 8) Adicionar ácido acético para separar los productos aminados bajo la forma de acetatos solubles en agua de otras sustancias presentes en la fase orgánica.
- 9) Después de neutralizar la fase acuosa y extraer con acetato de etilo, es obtenida una mezcla de los productos de adición de dimetilamina, entre los cuales debe estar el derivado de la hernandulcina
- 10) Adicionar yoduro de metilo, para formar la sal de amonio
- 11) Eliminar el grupo trimetilamina adicionando solución básica con carbonato de sodio
- 12) Extraer con acetato de etilo y concentrar en rotavapor
- 13) Separar la hernandulcina por cromatografía en columna Flash usando hexano- Me_2CO (17:3)
 R_f hernandulcina = 0.5
- 14) Derivatizar y realizar pruebas de identificación por CG-EM, espectrometría de masas y Resonancia Magnética Nuclear en el Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro.

8.6 Propuestas para la derivatización da hernandulcina

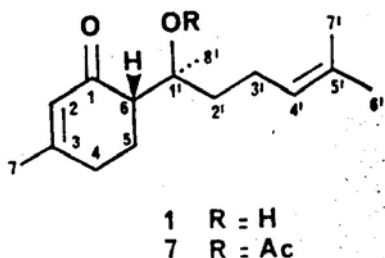
Después de aislar la hernandulcina, se propone derivatizarla para mejorar el análisis cromatográfico, para lo cual son propuestos tres procedimientos:

8.6.1 Método de Anhídrido trifluoroacético, basado em metodología de Lopes (1983) e Knapp (1979)

- 1) Enfriar 8.7 g de P_2O_5 a $-10^\circ C$.
- 2) Agregar 6.8 mL de CF_3COOH
- 3) Guardar en la refrigeradora con CO_2 seco (24 h)
- 4) Destilar el anhídrido trifluoroacético formado
- 5) Agregar a 0.5 mL de hernandulcina 1 mL de anhídrido trifluoroacético y TsOH (2%)
- 6) Mezclar y dejar que la reacción se desarrolle por 15 min
- 7) Separar y analizar por CG-EM.

8.6.2 Acetilación de la hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

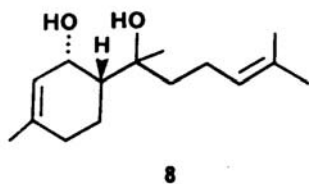
- 1) Mezclar 118 mg de hernandulcina aislada (0.5 mmol) con 0.4 mL de trietilamina e 0.4 mL $(CH_3CO)_2O$, en presencia de 150 g 4-(dimetilamino)piridina.
- 2) Agitar por 36 h.
- 3) Purificar por CCF preparativa.
- 4) Analizar por CG-EM. Picos de la hernandulcina acetilada (esquema 7): (m/z 278 (M^+ , 0.4%), 236 (1), 218 (34), 150 (17), 109 (100), 82 (25), 43 (70); UV (λ max 235 nm; log e 4.32).



Esquema 7. hernandulcina acetilada (R= Ac)

8.6.3 Reducción de la hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

- 1) Mezclar 200 mg de hernandulcina (0.85 mmol) con una cantidad equimolar de $NaBH_4$ en presencia de cloruro de samario hexahidratado (0,85 mmol) en metanol (0.5 mL)
- 2) Purificar por CCD preparativa en éter petróleo-acetona (17:3).
- 3) Analizar por UV (λ max = 210 nm; log e 3.69). (Esquema 8)



Esquema 8. Hernandulcina reducida.

Después de la derivatización la hernandulcina puede ser analizada por CG-EM y RMN.

8.7 Cromatografía Flash

Empacar la columna Flash en seco, con sílica gel seca y en la parte superior se coloca la pasta formada por la muestra y el solvente orgánico. Luego, adicionar una capa de 1 cm de sílica gel y con la llave de salida cerrada, adicionar el solvente orgánico (el de menor polaridad a utilizar en el experimento), cerrar por encima el sistema y se abre la llave de salida, aplicando presión por encima de la columna con un compresor. Colectar las diferentes fracciones y concentrar en rotavapor. Utilizar hexano:acetona (17:3) como fase móvil. Colectar las fracciones y realizar pruebas con placas de cromatografía en capa fina (CCF) para detectar las fracciones en que es eluida la hernandulcina.

8.8 Extracción de aceites esenciales por hidrodestilación con aparato tipo Clevenger

En vista que existen trabajos que indican que la hernandulcina se encuentra en el aceite esencial de orozú, en este trabajo se pretende evaluar el grado de extracción de hernandulcina que se logra por el método de obtención tradicional de aceites esenciales, la hidrodestilación, así como evaluar si existe descomposición de la sustancia durante el proceso, para lo cual se realizará también la extracción con por extracción-destilación simultáneas con el sistema Likens-Nickerson detallado en la siguiente sección.

Pesar 30 g de material vegetal en un balón de 250 mL, 24/40.

Agregar agua hasta pasar levemente el nivel de la mitad del balón.

Acoplar el balón con el aparato de extracción, y encender la estufa y la circulación del agua a través del refrigerante del aparato de destilación.

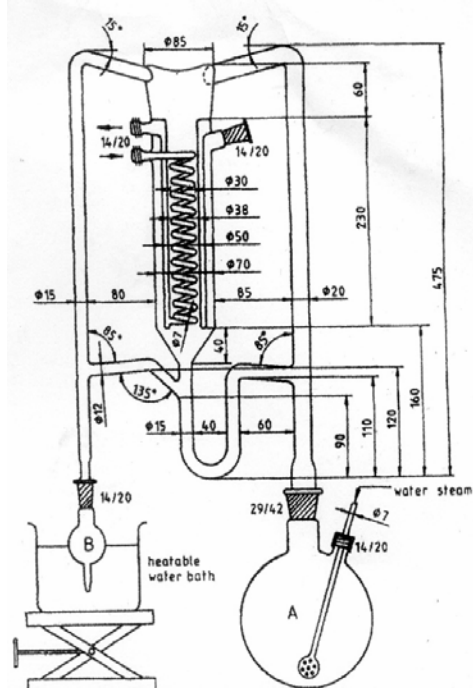
Destilar el aceite esencial por 3 h, contadas a partir de la hora en que se inicia la destilación. Apagar el aparato.

Colectar en n-pentano y concentrar en rotavapor. Medir luego la masa del aceite destilado y almacenar en un vial de 2 mL bajo refrigeración.

Almacenar la muestra en la refrigeradora, para su posterior análisis cromatográfico.

8.9 Extracción de aceites esenciales por extracción-destilación con aparato Likens-Nickerson (esquema 9)

Este método hace uso del arrastre con vapor para la destilación de los aceites esenciales a partir del material vegetal, y de la extracción entre solventes de diferente polaridad en fase gaseosa, generalmente con pentano. De esta forma, los aceites esenciales arrastrados por el vapor de agua, se mezclan con vapor de solvente en una cámara y son condensados disueltos en el solvente orgánico, el cual es separado por diferencia de densidades con el agua, evitándose posteriormente la circulación del aceite esencial y su contacto posterior con el agua y altas temperaturas, disminuyéndose la oxidación de los compuestos del aceite. Colocar 50 g de material vegetal seco y molido, en el balón de extracción (1 L) humedecer la muestra con agua destilada. Agregar agua hasta la mitad de la capacidad del Balón de generación de vapor (2 L), mientras que en el balón de solvente orgánico (150 mL) se agrega pentano (o en su defecto, hexano), hasta la mitad del mismo. Llenar la conexión en U de unión de los brazos de descarga de los solventes, con agua y el solvente orgánico, el cual quedará en la parte superior. Armar el equipo tal como se muestra en el esquema 1. Iniciar el calentamiento del agua y del solvente orgánico. Regular el flujo de vapor de manera que su totalidad se condense en la cámara con el serpentín, sin pasar al brazo del solvente orgánico. Colectar la muestra, hasta que el balón de muestra se llena con agua hasta el nivel inferior de la boca de ingreso del vapor. Concentrar la muestra en rotavapor.



Esquema 9. Aparato de extracción-destilación de Likens-Nickerson.

8.10 Análisis cromatográfico de los aceites esenciales y de hernandulcina aislada

Para la determinación de la composición de los aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, utilizar las condiciones cromatográficas publicadas por Adams (2002): Columna cromatográfica: J&W DB-5, 0,25mm d.i. x 30 m, 0.25 μ m de espesor de fase. Temperatura del Inyector: 220°C. Línea de transferencia: 240°C; programación de la temperatura del horno: 60°C a 246°C, a una tasa de incremento de 3°C/min. Gas acarreador: He a 34,96 cm/s o 1.02 mL/min. Inyección: 0.1 μ L (solución al 10%). Split: 1/20.

La hernandulcina aislada será analizada por cromatografía de gasea con detector de masas con las mismas condiciones que el aceite esencial, pero usando temperatura de inyector de 200°C y rampa de 10°C/min.

8.11 Análisis de las sustancias aisladas (hernandulcina y posibles isómeros) por Resonancia Magnética Nuclear

Las sustancias aisladas serán transportadas al Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales, donde serán determinados los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 para confirmación de la estructura de la hernandulcina y elucidación estructural de otras sustancias aisladas.

8.12 Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales de orozús

como parte de la caracterización del aceite esencial del orozús de diferentes procedencias, se realizará la determinación de su índice de refracción, por medio de la aplicación de 0.2 mL de aceite en el refractómetro.

8.13 Evaluación de resultados

Todos los análisis serán realizados por triplicado. La media y desviación estándar será obtenida para cada análisis.

La hipótesis será comprobada por medio de una prueba de t de student para comparar la concentración de hernandulcina y el límite de cuantificación.

Análisis de varianza de una vía será realizada para comparar el contenido de hernandulcina en diferentes poblaciones de *P. dulcis* y en el aceite esencial.

La técnica de Análisis de Componentes Principales será utilizada para comparar la composición de los aceites esenciales extraídos por las técnicas de hidrodestilación y de extracción-destilación simultáneas.

8.14 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, siendo empleada también con fines cuantitativos. La técnica se basa en que algunos núcleos atómicos (como el hidrógeno y el carbono-13) sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, puede emplearse para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos (Kubeczka y Formáček, 2002).

La RMN de transformada de Fourier, la más utilizada en la actualidad, permite disminuir drásticamente el tiempo que requiere para adquirir una acumulación un espectro completo. En vez de realizar un barrido lento de la frecuencia, una en cada instante, esta técnica explora simultánea e instantáneamente todo un rango de frecuencias. La RMN-TF funciona con la muestra (espines nucleares) sometida a un campo magnético externo constante. Se irradia la muestra con un pulso electromagnético de muy corta duración en la región de las radiofrecuencias. La forma de aplicación del pulso es rectangular, siendo así la intensidad de la radiofrecuencia oscila entre un máximo y un mínimo que es constante mientras dura el pulso. Un pulso de corta duración tiene una cierta incertidumbre en la frecuencia (principio de indeterminación de Heisenberg). La descomposición de Fourier de una onda rectangular contiene contribuciones de una de todas las frecuencias. El pulso que se genera es por tanto policromático y cuanto más corto sea, es capaz de excitar un mayor rango de frecuencias.

Al final se obtiene un espectro que presenta picos de absorción de acuerdo a la longitud de onda donde los núcleos presentan resonancia, esos picos son medidos con base en su “desplazamiento” a partir de una molécula de referencia. Esos desplazamientos son característicos para diferentes núcleos según su entorno, por lo que con base en esa información puede realizarse la elucidación estructural de las moléculas que los poseen.

8.15 Índice de refracción

El índice de refracción es una propiedad física de los aceites esenciales utilizada para el control de pureza, ya que los aceites esenciales de variedades o especies vegetales, presentan índices de refracción (indicador del grado de refracción de la luz polarizada), característicos (Bandoni, 2003). En el proyecto, se caracterizarán los aceites esenciales de cada especie estudiada, por su índice de refracción.

8.16 Diseño

El universo está constituido por las poblaciones de orozús (*P. dulcis*) de Guatemala. La muestra estará constituida por los especímenes de orozús que serán colectados para la extracción, aislamiento y análisis de la hernandulcina de la planta. La unidad experimental es la concentración de la hernandulcina en la planta en unidades de (mg/Kg de planta) y en porcentaje. En el caso de los aceites esenciales

la unidad experimental es el porcentaje masa/volumen en el caso de rendimiento y de área porcentual en el caso de la concentración.

En el diseño, cinco poblaciones de la planta serán localizadas. Un Kg como mínimo de partes aéreas de la planta será colectado y procesado en el laboratorio. La hernandulcina será extraída y aislada según la metodología descrita en la sección correspondiente.

Los análisis serán realizados por triplicado, desde la extracción del material vegetal. Será obtenida la media y desviación estándar de todos los resultados y un análisis de varianza será aplicado a los resultados para evaluar el contenido de hernandulcina en plantas de diferentes poblaciones, y también en el rendimiento de hernandulcina por los métodos de aislamiento propuestos.

La técnica de Análisis de componente principal será aplicada a los resultados de la composición del aceite esencial de *P. dulcis* extraído por los métodos de hidrodestilación y extracción-destilación simultáneas.

Los resultados de concentración de hernandulcina en la planta, rendimiento y concentración de componentes en los aceites esenciales y las pruebas estadísticas, serán presentados en cuadros y gráficas, para su mejor visualización.

8.17 Análisis de la información

Las muestras serán colectadas y codificadas, utilizando códigos de ocho dígitos, correspondiendo los dos primeros a las dos letras que identifiquen el lugar de colecta, cuatro números que identifiquen el mes y día de colecta, y dos cifras que identifiquen el número de la muestra en esa población.

Para el registro de la información de colecta se elaborarán formularios, donde se especifique la localización geográfica, condiciones climáticas y descripción de la población de orozús.

Los resultados generados del aislamiento y análisis de la hernandulcina y aceite esencial de orozús, serán presentados en cuadros y gráficas.

La hipótesis será evaluada por medio de una prueba t de student para verificar la diferencia entre la concentración de hernandulcina y el límite de cuantificación del método cromatográfico.

Las diferencias en los niveles de hernandulcina entre las poblaciones y entre métodos de aislamiento serán evaluadas por análisis de varianza. La composición del aceite esencial y porcentaje de hernandulcina en el mismo será evaluada por técnicas estadísticas de análisis multivariado.

El parámetro que será de utilidad para evaluar el potencial de la obtención de la hernandulcina del orozús guatemalteco será el contenido porcentual de la sustancia en las partes aéreas de la planta, y la factibilidad de su obtención por métodos de derivatización.

9 Resultados

9.1 Extracción, aislamiento y purificación de hernandulcina

9.1.1 Extracción con diclorometano y rendimiento:

Fueron realizadas varias pruebas para la extracción, aislamiento y purificación de la hernandulcina de orozús de tres diferentes poblaciones. En la siguiente tabla se presentan los resultados de rendimiento de extracción con diclorometano de orozús. Para la obtención del rendimiento, el solvente fue evaporado en un rotavapor y el rendimiento fue calculado a partir del porcentaje que el extracto seco representa del material vegetal extraído originalmente.

Tabla 1

Rendimiento de extracción (% peso/peso) de orozús utilizando diclorometano como solvente extractor.

Muestra	% rendimiento
CEDA, Ciudad Guatemala	3.87
El Junquillo, Barberena, Santa Rosa	2.44
El Chico, Usumatlán, Zacapa	3.10

9.1.2 Aislamiento de hernandulcina por Cromatografía Flash

La separación y aislamiento de la hernandulcina, fueron realizadas en el Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. 1.0 g del extracto de la muestra correspondiente a la localidad del CEDA fueron colocados en una columna para Cromatografía Flash de 3 cm de diámetro, empacada en seco con sílica gel 60 hasta una altura de 6 pulgadas. La muestra fue colocada seca, mezclada con una fracción de sílica gel. La cromatografía fue desarrollada utilizando una mezcla de hexano-acetona en proporciones 17:3, como fase móvil, colectándose fracciones de 20 mL. Cada fracción fue analizada por Cromatografía en Capa Fina utilizando cromatoplasmas de Sílica gel y la misma fase móvil utilizada en la cromatografía en columna. Trece fracciones presentaron compuestos. En la siguiente tabla se presentan los resultados de la separación:

Tabla 2.

Fracción	Número de manchas	Valores de Rf	Observaciones
1	2	0.73, 0.53	Mancha con Rf 0.73 de color amarillo, Rf de 0.53 visible con luz UV de 254 nm
2	3	0.73, 0.53, 0.37	Mancha en Rf 0.37 visible con luz UV de 254 nm
3	3	0.53, 0.37, 0.34	Mancha con Rf de 0.34 visible

			con luz UV de 254 nm
4	2	0.37, 0.34	
5	3	0.34, 0.23, 0.14	Mancha con Rf de 0.23 visible con luz UV de 254 nm; con Rf 0.14 de color verde.
6	3	0.34, 0.23, 0.14	
7	3	0.34, 0.23, 0.14	
8	2	0.23, 0.14	
9	3	0.23, 0.14, 0.082	Mancha con Rf 0.082 de color verde
10	3	0.23, 0.14, 0.082	
11	2	0.14, 0.082	
12	2	0.14, 0.082	
13	1	0.082	
14	1	0.082	

Luego de la obtención de las fracciones anteriores, fueron analizados los espectros UV de las fracciones 2, 3, 4 y de una muestra compuesta de las fracciones 5, 6 y 7. Se encontró que el espectro de las fracciones 5, 6 y 7 correspondía con el máximo de absorción esperado para la hernandulcina (aproximadamente 228 nm), por lo que luego de combinarse, fueron separadas por otra cromatografía en Columna Flash con las mismas condiciones que el experimento anterior, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3

Separación de la muestra compuesta de las fracciones 5, 6 y 7 de la cromatografía Flash del extracto de orozú del CEDA.

Fracción	Número de manchas	Valores de Rf	Observaciones
1C	0	N.A.	
2C	0	N.A.	
3C	0	N.A.	
4C	0	N.A.	
5C	1	0.35	Muy escasa
6C	1	0.35	Mancha grande (diámetro 1.0 cm). 93.8 mg.
7C	2	0.35, 0.23	Manchas grandes, con diámetro de 1.0 cm (Rf = 0.35) y 0.8 cm (Rf = 0.23). 74.3 mg.
8C	3	0.35, 0.23, 0.14	Manchas grandes, con diámetro de 1.0 cm (Rf = 0.35) y 0.8 cm (Rf = 0.23). Mancha con Rf = 0.14 con diámetro menor (0.4

			cm). 110 mg.
9C	3	0.35, 0.23, 0.14	Manchas grandes, con diámetro de 0.6 cm (Rf = 0.35) y 0.8 cm (Rf = 0.23). Mancha con Rf = 0.14 con diámetro menor (0.4 cm)
10C	2	0.23, 0.14	Manchas pequeña (diámetro 0.3 cm)
11C	0	N .A.	

N.A = No aplica.

La fracción 6C fue dividida, de manera que 3 mg fueron utilizados para Espectrometría de Masas, 40 mg para RMN y 10 mg para HPLC.

La fracción 7C fue separada en sus componentes por Cromatografía en Capa Fina Preparativa, utilizando las mismas condiciones (Fase estacionaria: Sílica gel; Fase móvil: hexano-acetona, 17:3), para ser utilizados como estándares para análisis cualitativos y cuantitativos de hernandulcina.

10 Discusión

Fue confirmada la presencia de hernandulcina en orozús de Guatemala, habiendo sido identificada inicialmente en la fracción volátil de la planta, al analizarse preliminarmente por Microextracción en Fase Sólida en combinación con Cromatografía de Gases con Detector de Masas.

Posteriormente se diseñó la estrategia para poder aislar la hernandulcina, considerándose que la extracción directa con diclorometano era la forma más eficiente de extraer la sustancia, ya que en estudios previos (Souto Bachiller, 1997), se había utilizado una extracción previa con hexano y otra con diclorometano, conteniendo ambas a la hernandulcina. Así, se consideró que la extracción con diclorometano permitiría obtener la mayor parte de la hernandulcina. Los rendimientos de extracción para las tres poblaciones de orozús estudiadas, se presentan en la Tabla 1, donde se observa que el material colectado en CEDA tiene el mayor rendimiento.

En vista que se obtuvo mayor cantidad de extracto seco en la muestra del CEDA, esta fue utilizada para la identificación y purificación de la hernandulcina, en el Núcleo de Pesquisas de Productos Naturales de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. Así, como puede verse en la Tabla 2, se realizó la separación de los diferentes compuestos presentes en el extracto, por cromatografía en Columna Flash, obteniéndose 20 fracciones de 20 mL, de las cuales 13 presentaron compuestos. En total se observaron manchas con siete diferentes valores de Rf, siendo la del Rf mayor (0.73), un compuesto que presentó coloración amarilla, mientras que los que presentaron valores menores de Rf (0.14 y 0.08), presentaron coloración verde, correspondiendo a la clorofila. De esta manera, se descartaron las fracciones que contenían únicamente estos compuestos, y con base en los espectros UV obtenidos con las fracciones 2, 3, 4 y la muestra compuesta de las fracciones 5, 6 y 7 (combinadas por presentar compuestos con los mismos valores de Rf), se determinó que la hernandulcina debía estar presente en la muestra compuesta. Esto, debido a que la muestra compuesta presentó un máximo de absorción en 228 nm, con mucha intensidad, debiendo realizarse varias diluciones para obtener un espectro adecuado. La Figura 1 muestra los espectros UV de las cuatro muestras analizadas.

Posteriormente, la muestra compuesta por las fracciones 5, 6 y 7 fue separada por cromatografía en columna Flash, utilizando las mismas condiciones experimentales que en el experimento anterior. Los resultados se presentan en la Tabla 3, donde puede apreciarse que el compuesto con Rf 0.35 se obtuvo altamente purificado en la fracción 6, obteniéndose 93 mg, lo cual es una cantidad suficiente para realizar las diferentes pruebas de caracterización. La fracción 7 que contenía dos compuestos (Rfs 0.35 y 0.23), de la cual se obtuvieron 74.3 mg, fue separada por Cromatografía en Capa Fina Preparativa, para la obtención de estándares de utilidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de hernandulcina.

Las pruebas de RMN, Espectrometría de Masas y HPLC confirmaron que la sustancia con Rf 0.35 es la hernandulcina. El cromatograma obtenido por HPLC en fase normal, se presenta en la Figura 2, donde puede apreciarse el pico de la hernandulcina con un tiempo de retención de 11.88 min, detectada a 228 nm. Una pequeña impureza que no representa dificultades para el uso de la hernandulcina como estándar puede apreciarse en el cromatograma con un tiempo de retención de 10.2 min. El espectro UV del pico de hernandulcina en el cromatograma obtenido por HPLC puede apreciarse en la Figura 3.

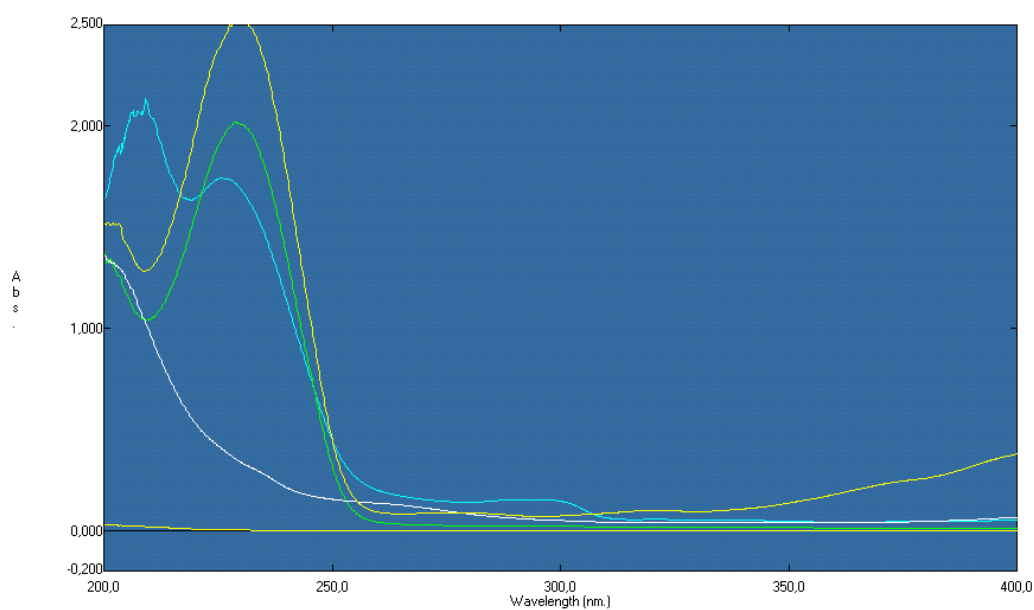


Figura 1. Espectros UV, de las fracciones 2, 3, 4 y 5-7. Espectrofotómetro Shimadzu UV 1601. Gris: FR2; Azul: FR3; Verde: FR4; Amarillo: FR567

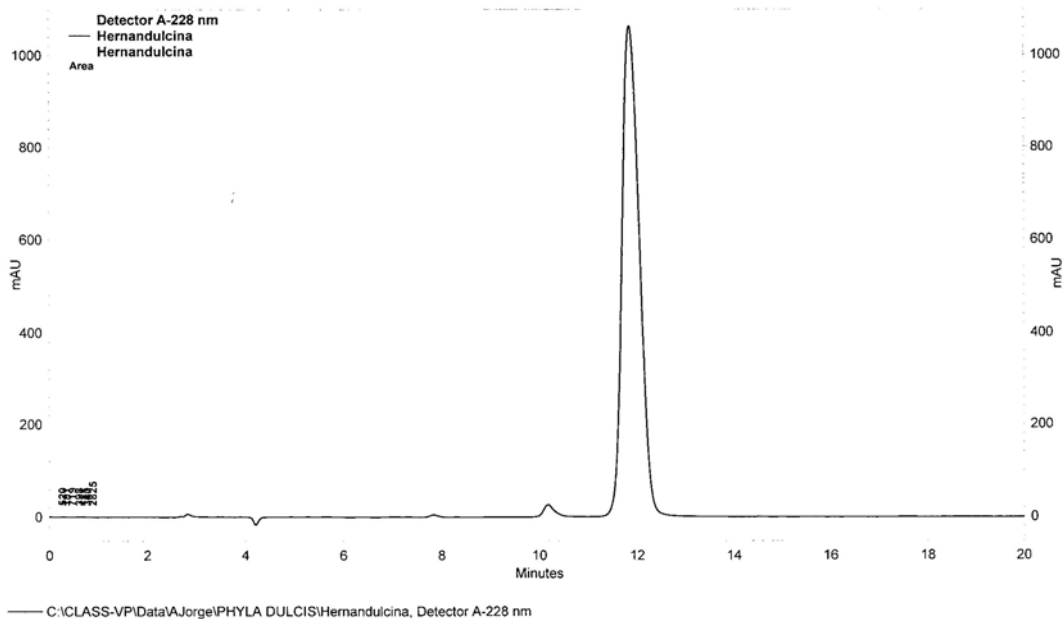


Figura 2. Cromatograma de la Fracción 4C de orozús. El pico de la hernandulcina se localiza en un tiempo de retención de 11.88 min. En 10.2 aparece una impureza en muy baja concentración, que no afecta el uso de la hernandulcina aislada, como estándar.

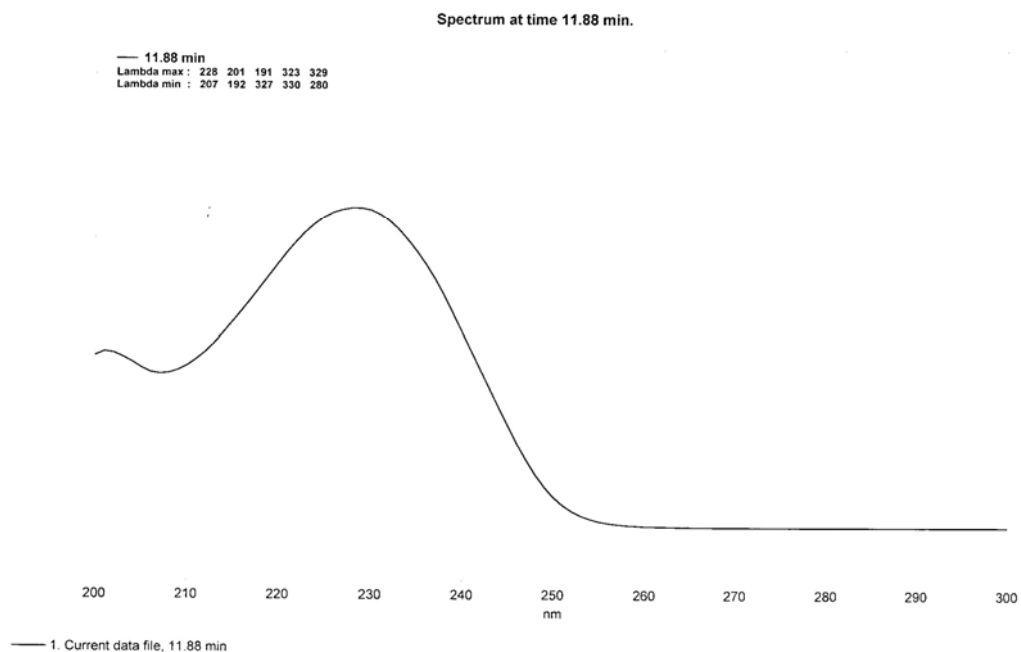


Figura 3. Espectro UV del compuesto con tiempo de retención 11.88 min por HPLC fase normal, que corresponde a la hernandulcina.

En la figura 4 puede apreciarse el espectro de masas obtenido por el análisis de 1 mg de la fracción 6C. El espectro de masas obtenido corresponde con el patrón de fragmentación de masas de la hernandulcina descrito por Compadre *et al.* (1987 (Figura 5). En el espectro pueden observarse los picos de ión molecular en 236 m/z de la eliminación del agua en 218 m/z, su posterior fragmentación (137m/z), y otros picos importantes en la identificación de la sustancia (153, 95, 82 e 69 m/z).

13/11/2009 16:31:23

C:\GCMSolution\CRIS\GH13112009.d06.QGD

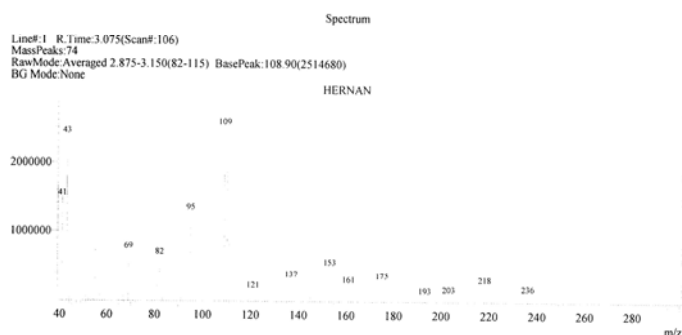


Figura 4. Espectro de masas del compuesto aislado en la fracción 6C, de orozú del CEDA, que corresponde al espectro de masas de la hernandulcina. Espectro obtenido en el NPPN/UFRJ, Brasil.

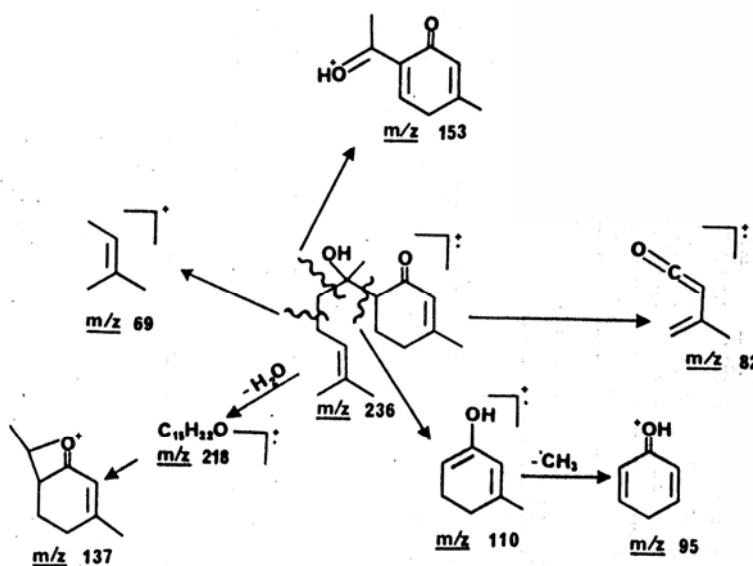


Figura 5. Patrón de fragmentación da hernandulcina (Compadre *et al.*, 1987)

De esta forma, se ha obtenido la hernandulcina en forma pura, por lo que la técnica de cromatografía Flash puede considerarse apropiada para la obtención de hernandulcina en forma pura con el propósito de utilizarla para otros ensayos en el laboratorio. Los resultados también indican que la composición del orozús (*P. dulcis*) de Guatemala, tiene una composición similar a la reportada por Souto Bachiller (1998), por lo que de existir otro quimiotipo con escasa o nula presencia de hernandulcina, como fue sugerido por Compadre, la planta que crece en Guatemala corresponde al mismo quimiotipo que la estudiada en Puerto Rico.

La obtención de la hernandulcina del orozús guatemalteco, también indica que la planta presenta potencial para la utilización de este principio dulce en algunos productos como edulcorante, no como sustituto del azúcar, sino para su uso en productos de higiene, luego que sean realizadas las pruebas de toxicidad y viabilidad necesarias. Así mismo, es importante que se realicen experimentos de cultivo que permitan evaluar las posibles diferencias en el contenido de hernandulcina de diferentes procedencias, al cultivarse en un mismo lugar.

11 Conclusiones

El orozús (*P. dulcis*) de Guatemala, presenta hernandulcina en cantidades que permiten su aislamiento, purificación y caracterización por técnicas cromatográficas.

El orozús de Guatemala presenta composición similar al orozús de Puerto Rico.

La técnica de Cromatografía en Columna Flash es apropiada para aislar y purificar la hernandulcina sin degradación de la misma.

El contenido de hernandulcina en el aceite esencial de orozús es muy bajo, no pudiendo ser cuantificado por cromatografía de gases.

La metodología de purificación de hernandulcina permite utilizar este compuesto como estándar analítico y para ensayos como edulcorante y de actividad biológica.

12 Recomendaciones

Es importante realizar estudios de domesticación del orozús de diferentes procedencias, para evaluar el contenido de hernandulcina y las posibilidades de producción de este sesquiterpenoide.

Es necesario llevar a cabo diferentes estudios de experimentación *in vitro* y farmacológicos para evaluar el posible efecto tóxico de la hernandulcina pura.

Se recomienda realizar estudios de composición química en otros órganos del orozús para realizar comparaciones entre los mismos.

13. Referencias y Bibliografía

Adams, R.P. (2001) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL 456 p.

Bandoni, A. (2003). Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Buenos Aires, CYTED. pp31.

Bicchi, C., Rubiolo, P., Cordero, Ch. (2006) Separation science in perfume analysis. Anal. Bioanal. Chem. 384:53-56.

Cáceres, A. (1998) *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. Colección Monografías, Vol. 1 Editorial Universitaria, Guatemala, 1996.

Compadre C.M., L., Pezzuto, J.M., Kinghorn, D., Kamath, S.K. (1985) Hernandulcin: An intensely Sweet Compound Discovered by Review of Ancient Literature.

Compadre C.M., Hussain, R.A., López de Compadre, L., Pezzuto, J.M., Kinghorn, D. (1987) The intensely Sweet Sesquiterpene Hernandulcine: Isolation, Synthesis, Characterization, and Preliminary Safety Evaluation. J. Agric. Food Chem. 35:273.

Craveiro, A.A., Fernandes, A.G., Andrade, C.H., Matos, F.J., Alencar, J.W., Machado, M.I. (1981) Oleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza, Brasil, Edicoes UFC. 209 p.

Guenther, E. (1948). *The Essential Oils*. New York, Van Nostrand Company Vol. 1. P.189-200.

Hostettmann, K., Queiroz, E., Vieira, P. (2003). Princípios Ativos de Plantas Superiores. Sao Carlos, Brasil, Edufscar.

Jayes, P.G., de León, J.L., Navas, R.P., Pérez, J.F., Mérida, M.S., Farfán, C. (2007) Aceites esenciales de nueve plantas nativas de Guatemala, Familias Verbenaceae y Lauraceae. Informe Final Proyecto Investigación. Fac. Farmacia/DIGI/USAC.

Kaneda, N., Lee, I.S., Gupta, M.P., Soejarto, D.D., Kinghorn, D. (1992) (+)-4b-Hydroxy-hernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. J. Nat. Prod. 55: 1136-1141

Kim, J.H., Lim, H.J., Cheon, S.H. (2003) A facile synthesis of (6S,1'S)-(+)-hernandulcin and (6S,1'R)-(+)-epihernandulcin. Tetrahedron 59:7501-7507.

Knapp, D.R. (1979) Handbook of analytical Derivatization Reactions. John Wiley and Sons. New York. Pp. 32-33.

Kubeczka, K.H., Formáček, V. (2002) Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 NMR Spectroscopy, 2nd. ed.; Wiley: New York.

Lima, P. D.D.B. (1983) Desenvolvimento de um novo método específico para o isolamento de lactonas-metilênicas. Reinvestigação de *Vanillosmopsis erythropappa* Sch.-Bip. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais. UFRJ. 153 p.

Lima, P. D.D.B., Garcia, M., Rabi, J.A. (1985) Selective extraction of α -methylene- γ -lactones. Reinvestigation of *Vanillosmopsis erythropappa*. J. Nat. Prod. 48:986.

Lopes, C.C. (1983) Utilização de Alilbenzenos naturais como matéria prima na síntese orgânica. Parte A. Preparação de derivados C6-C2. Parte B. Síntese de 6,7-metilenodoxi-3-alkil-2-hidroxi-1,4-naftoquinonas a partir do safrol. Tese de mestrado. Núcleo de Pesquisas Naturais, UFRJ. P. 493-494.

Marriot, P.J., Shellie, R., Cornwell, Ch. (2001) Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. J. ff Chromatogr. A. 936:1-22.

Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology. J. of Ethnopharm. 76:201.

Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2003). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitius* Grown on the Islands Pico, Faial and Graciosa (Azores). Phytochemical Analysis, 14, 228-231

Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G., Scheffer, J.J.C. (2000). Chemical Polymorphism of the Essential Oils from Populations of *Thymus caespitius* Grown on the island S. Jorge (Azores). Phytochemistry, 55, 241-246.

Pérez, J.F., (2008) Investigación Química de óleos esenciales de plantas nativas da Guatemala. Tesis doctoral. Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 254 p.

Shallenberger R.S., Acree, T.E., (1967), Molecular Theory of Sweet Taste. Nature 216:480-482

SoutoBachiller, F.A., De Jesús Echeverría, M., Cárdenas González, O.E., Acuña-Rodríguez, M.F., Meléndez, P.A., Romero-Ramsey, L. (1997) Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. Phytochem 44 (6): 1077-1086

Standley, P. Steyermark, 1970. Flora de Guatemala, part IX. Fieldiana: Botany, USA. 1970, vol. 24. 209-211.