

OBTENCIÓN NO CROMATOGRÁFICA DEL ÁCIDO ROSMARÍNICO A PARTIR DE UNA PLANTA MEDICINAL PERUANA: *lepechinia meyenii walp. Epling (Lamiaceae) “Puna salvia”*

Susan Fajardo Canal, Ana Lechuga Chacón, Celina Luizar Obregón, Carlos Serrano Flores, Mijail Cjuno Quispe, Jorge Choquenaira Pari y Janet Gonzales Bellido,

141

Con el propósito de evaluar la actividad antioxidante de las especies sur andinas de la Tribu Mentheae (*Nepetoideae, Lamiaceae*) se hizo necesario disponer de pequeñas cantidades de ácido rosmarínico con fines de comparación.

La especie de partida para tal fin no es un representante de las especies europeas como serían el romero (*Rosmarinus officinalis*) o el toronjil (*Melissa officinalis*) que, como se sabe, contienen esta sustancia. En realidad la quimiotaxonomía indica que podríamos obtener ácido rosmarínico de cualquier representante de la tribu Mentheae (1); algunos ejemplos tomados de la flora medicinal del Cusco (2), (3), aparecen en la tabla 1:

Se eligió a *Lepechinia meyenii* por ser conocida en Cusco como *Puna Salvia* y tener uso medicinal muy difundido. Incluso, un estudio hecho para la provincia de Espinar muestra que esta planta medicinal es la tercera en ser utilizada por los pobladores (4).

Además, porque en un trabajo anterior (5) se mostró la composición del aceite esencial

de esta planta, así como la presencia de ácido rosmarínico y cafeico por cromatografía de capa fina y espectroscopia UV, tanto como la actividad antioxidante por el método del azul de molibdeno. 100 µg de extracto acuoso y metanólico son tan antioxidantes como 22.73 y 20.57 µg de vitamina C, respectivamente (6).

De manera que para evaluar la actividad antioxidante y el contenido de ácido rosmarínico en las especies cusqueñas de la tribu Mentheae, hay que disponer el patrón de ácido rosmarínico que se va a obtener a partir de *Lepechinia meyenii*.

PARTE EXPERIMENTAL

Para purificar el ácido rosmarínico a partir de *L. meyenii*, se tuvo en cuenta el trabajo original de Scarpati, tomado de la referencia (7) y también de las referencias (8) para la extracción; (9) para el sistema de cromatografía en capa fina; (10) para la cromatografía en columna de Si Gel; (11) y (12) para los espectros UV y (8), y (13) para la espectroscopia IR. Hay que advertir que el aislamiento y síntesis

Tabla N° 1. Plantas medicinales cusqueñas que pertenecen a la subfamilia.

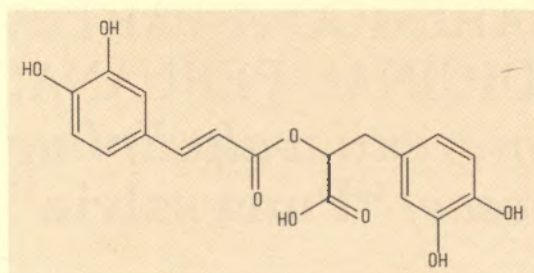
| | |
|-------------------------------|---|
| • <i>Hedeoma andonianum</i> | • <i>Origanum majorana</i> |
| • <i>Hyptis mutabilis</i> | • <i>Origanum vulgare</i> |
| • <i>Melissa officinalis</i> | • <i>Rosmarinus officinalis</i> |
| • <i>Mentha viridis</i> | • <i>Salvia dombeyi</i> |
| • <i>Minthostachys andina</i> | • <i>Salvia oppositiflora</i> |
| • <i>Minthostachys setosa</i> | • <i>Satureja boliviana</i> |
| • <i>Ocimum basilicum</i> | • <i>Satureja nubigena</i> |
| • <i>Ocimum micranthum</i> | • <i>Sphacele tenuiflora</i> (sin. <i>Lepechinia meyenii</i>) |



Figura N° 1. *Lepechinia meyenii* en Tambomachay a 3700 msnm.

del ácido rosmarínico no es una historia terminada y así lo demuestran las referencias (14), (15) y (16).

El ácido rosmarínico tiene la siguiente estructura:



Es una molécula soluble en agua, etanol, metanol, acetato de etilo y en menor proporción en dietil éter. Conviene averiguarle su logD. El logP se define por:

$$\log P = \log \frac{[HA]_{\text{octanol}}}{[HA]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

y muestra cuán lipofílico (mayor logP) es un soluto a pH neutro. Para sustancias ionizables, es mejor utilizar el log D. El log D para una sustancia ácida se define por:

$$D = \frac{[HA]_o + [A^-]_o}{[HA]_{\text{H}_2\text{O}} + [A^-]_{\text{H}_2\text{O}}}$$

que muestra la lipoficidad del ácido en todo el rango de pH. El gráfico de logD (Figura 2) se ha simulado utilizando el programa ACD6 (18).

Para el proceso de purificación se debe tener en cuenta este comportamiento así predicho. Así, en un trabajo anterior (19) se

purificó AR cromatográficamente y también no cromatográficamente. El primer método, cromatográfico, da un producto más puro, 0.58% respecto al peso de planta seca. El segundo método, sacrificando un poco la pureza, permite obtener a menos costo esta sustancia en un 0.68%.

Sin embargo, el último método, de posible aplicación tecnológica, implicaba particiones con NaHCO₃ al 5% (pH 10) y luego acidificación, que podría afectar la sustancia –disminuyendo el rendimiento. La lectura de (16) y el cálculo de log D sugerían que este juego de particiones podría arreglarse y hacer un método aún más simple. De eso trata este trabajo.

PROCEDIMIENTO

104 g de hojas de *Lepchinia meyenii* desmenuzadas, se maceraron primero con 2L de agua hirviendo por 24 hrs. y luego con 1L más de agua hirviendo, por igual tiempo. Los extractos se filtran por algodón, se juntan y se ponen a pH 2.37. Este extracto acuoso ácido se reparte con varias porciones de acetato de etilo. El residuo acuoso se desecha y la fase orgánica se deseca con MgSO₄; luego se evapora a sequedad a 40°C.

El extracto de AcOEt se disuelve en agua caliente y se hace enfriar por 12 horas a 4° C, con lo que precipita una sustancia resinosa que se desecha. El líquido claro sobrenadante cuyo pH es 2.89, se extrae repetidamente con Et₂O. El

Figura N° 2. El log D del ácido rosmarínico simulado con ACD 6 (18).

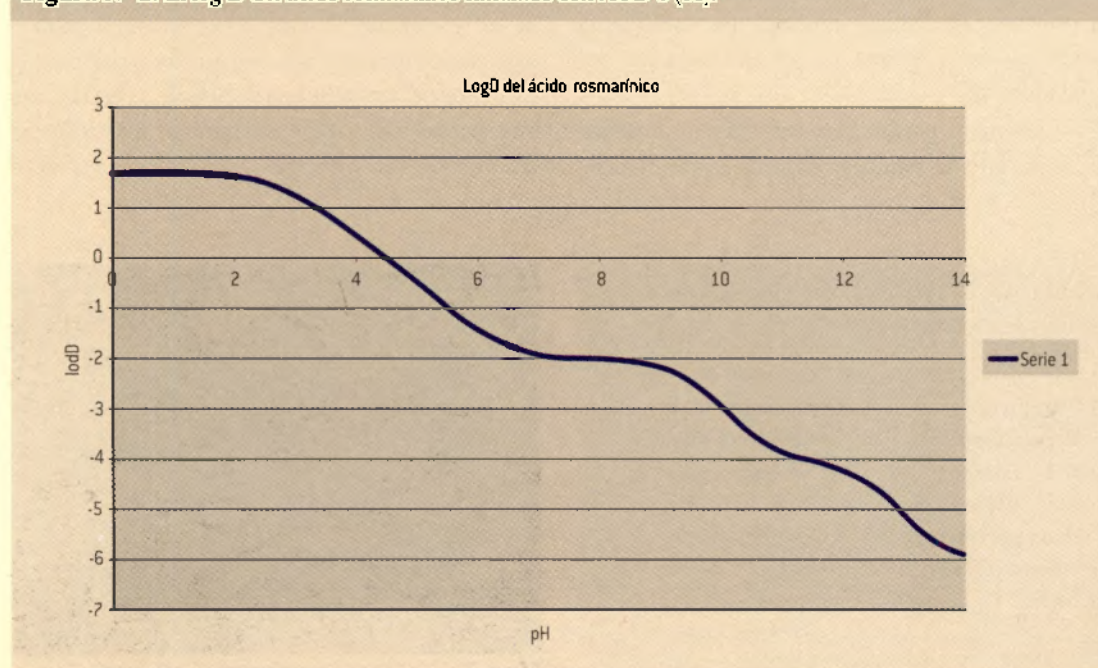
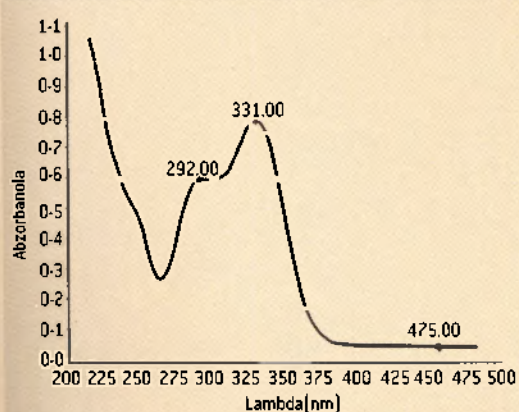


Figura N° 3. Espectro Ultravioleta: Se observan 2 máximos a 292 y 331 nm.



extracto etéreo, luego de secarse y evaporarse a sequedad se disuelve en el menor volumen posible de agua caliente que por repetidos enfriamientos a 4° C y abandono en desecador con ácido sulfúrico, precipita finalmente un sólido amarillo que se lava con agua helada y se deseca sobre ácido sulfúrico, obteniéndose 2.55 g de un sólido crema -2.5% de rendimiento- que es el ácido rosmarínico.

Caracterización del ácido rosmarínico

Cromatografía en capa fina: Utilizando cromatoplasas de SiGelG 60, como líquido desarrollador C₆H₆: AcOEt:HCO₂H (36:12:5) y

Tabla N° 2. Datos espectroscópicos HNMR según Wang (22) a 300 MHz y en deuteroacetona.

- δ 3.03 (2H, m, H-7)
- δ 5.20 (1H, m, H-8')
- δ 6.29 (1H, d, J = 16 Hz, H-8)
- δ 6.61-6.87 (4H, m, H-5, H-2', H-5', H-6')
- δ 7.03 (1H, dd, J = 8 Hz, 2 Hz, H-6)
- δ 7.16 (1H, d, J = 2 Hz, H-2)
- δ 7.55 (1H, d, J = 16 Hz, H-7)

FeCl₃ al 5% como revelador el AR tiene un R_f de 0.15, tal como se describe en (9).

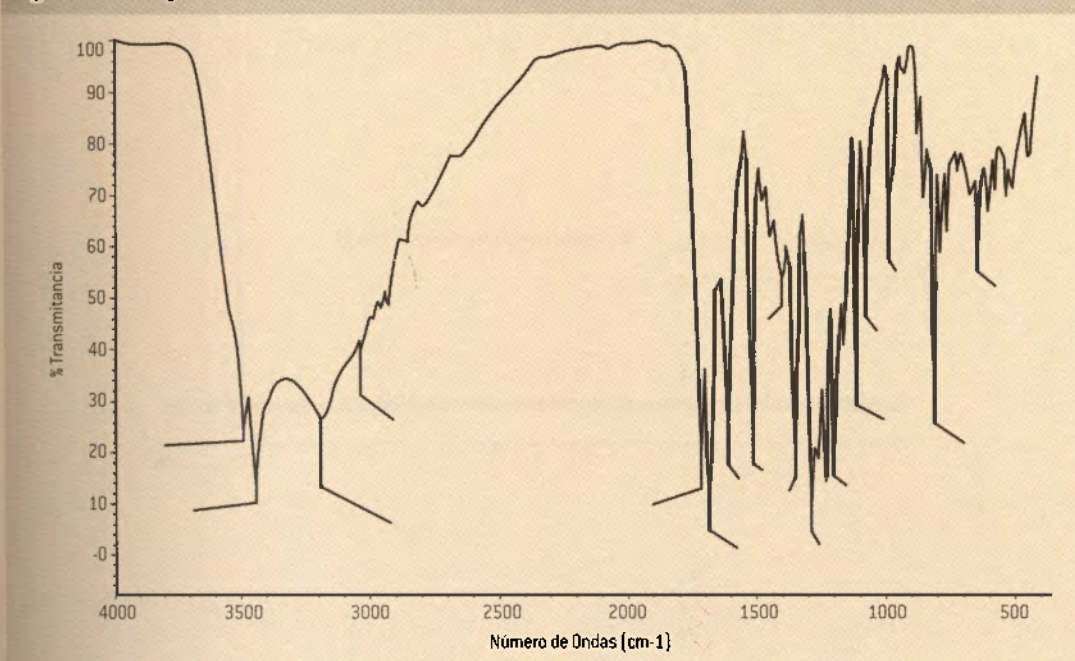
Figura 3. El espectro corresponde a las descripciones publicadas en (11) y (12).

Figura 4. También el espectro infrarrojo se muestra como los de la literatura (20), (21).

Figura 5. Comparando nuestros resultados espectroscópicos con aquéllos descritos en (22) se observa gran concordancia de señales. En esta referencia, la numeración de los carbonos en el AR aparece en la figura 6.

Los datos espectroscópicos de RMN muestran un ácido rosmarínico puro con agua de constitución incluida que aparece en el pico HNMR a 3.38 ppm, porque la sustancia está precipitada de agua precisamente. *Lepechinia meyenii* es una buena materia prima para hacer AR porque el contenido fenólico de esta planta es prácticamente solo AR (5).

Figura N° 4. Espectro infrarrojo.



Se dispone ahora de una sustancia referencial para evaluaciones cuantitativas de AR y actividad antioxidante en las plantas de la tribu *Menthae*. Además, es la primera vez que se describe el aislamiento de esta sustancia para esta especie. Dado el alto rendimiento en AR, el presente método de obtención puede traducirse a escala industrial.

INSTRUMENTACIÓN

El espectro UV fue determinado con el equipo UV-Vis Evolution 300 de ThermoElectronics. El espectro IR se tomó en un equipo Nicolet 380. También de ThermoElectronics. Los espectros de RMN se desarrollaron en un equipo Bruker AC300 de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

Agradecimiento

A la UNSAAC, pues el presente trabajo es parte del Proyecto FEDU 2007-2008. **Componentes Fenólicos de Plantas Cusqueñas de la Tribu *Menthae* (*Nepetoideae*, *Lamiaceae*)**. Al laboratorio de RMN de PUCP donde, por los buenos encargos de los profesores. Helena Maruenda y Alex Nieva, se desarrollaron los espectros NMR durante la II Conferencia Internacional Spectra 2009.

Figura N° 6. La numeración de los carbonos en el AR según (22).

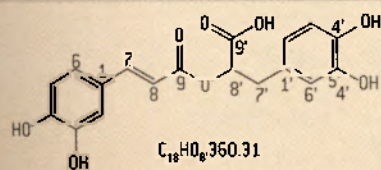


Tabla N° 3. Datos espectroscópicos HNMR del presente trabajo.

- δ 2.93 (2 H, m, H-7')
- δ 5.02 (1H, m, H-8')
- δ 6.24 (1 H, d, J= 15.9 Hz, H-8)
- δ 6.50-6.77 (4H, m, H-5, H-2', H-5', H-6')
- δ 7.00 (1H, dd, J=7.5 Hz, 1.8 Hz, H-6)
- δ 7.05 (1H, d, J=1.8 Hz, H-2)
- δ 7.46 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7)

Tabla N° 4. Valores de δ_{13} CNMR según Wang (22) a 75 MHz en deuteroacetona comparados con nuestros valores también a 75 MHz pero en dDMSO.

| Wang | Carbono | Presente trabajo |
|-------|---------|------------------|
| 171.2 | 9' | 170.913 |
| 166.8 | 9 | 165.979 |
| 149.0 | 4 | 148.665 |
| 146.5 | 3 | 145.985 |
| 146.3 | 7 | 145.632 |
| 145.7 | 3' | 144.965 |
| 144.7 | 4' | 144.045 |
| 129.1 | 1' | 127.323 |
| 127.3 | 1 | 125.370 |
| 122.7 | 6 | 121.654 |
| 121.6 | 6' | 120.080 |
| 117.3 | 2' | 116.714 |
| 116.3 | 5 | 115.788 |
| 115.5 | 5' | 115.413 |
| 115.2 | 2 | 114.907 |
| 114.8 | 8 | 113.270 |
| 73.7 | 8' | 72.891 |
| 37.4 | 7' | 36.132 |

BIBLIOGRAFÍA

(1) WINK M. et al.

2003. "Evolution of Secondary Metabolites from an Ecological and Molecular Phylogenetic Perspective". *Phytochemistry*, 64, 3-19.

(2) ROERSCH C. y VAN DER HOOGTE L.

1988. *Plantas Medicinales del Sur Andino del Perú*. Centro de Medicina Andina.

(3) ROERSCH C.

1994. *Plantas Medicinales del Sur Andino del Perú*. Centro de Medicina Andina.

(4) HAHOLD A. y KROEGER A.

1990. *Superación de la Enfermedad en las Alturas de los Andes del Perú*. Centro de Medicina Andina.

(5) FAJARDO S. VALENCIA A. SERRANO C.

2007. *Estudio de la Composición y Actividad Antioxidante de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling (*Lamiaceae*)*. XXIII Congreso Peruano de Química. Lima.

(6) PRIETO P. et al.

1999. "Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex. Specific Application to the Determination of Vitamin E". *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.

(7) ELLIS B. & TOWERS G.

1970. "Biogenesis of Rosmarinic Acid in *Mentha*". *Biochemical J.* 118, 291-297.

- (8) **STAHL E.**
1986. *Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen* Gustav Fischer Verlag.
- (9) **BARICEVIC D. et al.**
2001. "Topical anti-Inflammatory Activity of *Salvia officinalis* L. Leaves. The Relevance of Ursolic Acid". *J. Ethnopharmacology* 75(2-3), 125-132.
- (10) **MOHAGHEGHZADEH A. et al.**
2004. "Rosmarinic Acid from *Zataria Multiflora* Tops and in Vitro Cultures". In: *Fitoterapia* 72, 315-321 .
- (11) **TRONCOSO N. y Col.**
2005. "Fast HPLC and UV-Vis Quantification of Principal Phenolic Antioxidants in Fresh Rosemary". *J. Chromatography A* 1100, 20-25.
- (12) "Wang H. et al. 2004. Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in Aromatic Herbs by HPLC". *Food Chemistry* 87, 307-311.
- (13) **STEHFEST K. et al.**
2004. "Fourier Transform IR as a New Tool to Determine Rosmarinic Acid in Situ". *J. Plant Physiology* 161, 151-156.
- (14) **PETERSEN M. & SIMMONDS M.**
2003. "Rosmarinic Acid". In: *Phytochemistry* 62, 121-125.
- (15) **ZELIC B. et al.**
2005. "Recovery and Purification of Rosmarinic Acid from Rosemary Using Electrodialysis." In: *Acta Chimica Slov.* 52, 126-130.
- (16) **BOYADZHIEV L. & DIMITROVA V.**
2006. "Extraction and Liquid Membrane Preconcentration of Rosmarinic Acid from Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.)". In: *Separation Science & Technology* 4, 877-886.
- (17) **WAKSMUNDZKA-HAJNOS M., SHERMA J. KOWALSKA T.**
2008. *TLC. Chromatography in Phytochemistry* CRC Press.
- (18) **www.acdlabs.com**
- (19) **GJUNO M., CHOQUENAIRA J, SERRANO C.**
2009. "Separación del Acido Rosmarínico a partir de *Lepechinia Meyenii* Walp.Epling (Lamiaceae)". En: *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas. UNSAAC* N°1.
- (20) **NAJATANI N. & KIKUZAKI H.**
1989. "Structure of a New Antioxidative Phenolic Acid from Oregano (*Origanum vulgare* L.)" In: *Agric. Biol. Chem.* 53 (2), 519-24.
- (21) **ROLANDO A. Y GONZÁLEZ M.**
2005. "Chemical study of Water Extract of Argentine Comercial Origanum". In: *J. Argentinian Chemical Soc.* 93 (4-6).
- (22) **WANG M. et al.**
1998. "Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*)." In: *J. Agricultural & Food Chemistry* 46(12), 4869-4873.