

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN EXPERIMENTAL Y COMPUTACIONAL DE EUGENOL EN ALBAHACA DE SAL (*Ocimum basilicum L.*) Y ALBAHACA DE DULCE (*Ocimum americanum*)

ISOLATION AND EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL CHARACTERIZATION OF EUGENOL IN SALT BASIL (*Ocimum basilicum L.*) AND SWEET BASIL (*Ocimum americanum*)

Juan Francisco Almeida L.<sup>1</sup> & Lorena Meneses O.<sup>1</sup>

**Palabras claves:** Eugenol, albahaca de sal, albahaca de dulce, solubilidad, espectroscopía de infrarrojos

**Keywords:** Eugenol, salt basil, sweet basil, solubility, infrared spectroscopy.

## RESUMEN

El objetivo principal del presente trabajo, fue el aislamiento y la caracterización experimental y computacional de eugenol en la albahaca de sal (*Ocimum basilicum L.*) y la albahaca de dulce (*Ocimum americanum*). Se utilizaron tres técnicas para la extracción del aceite esencial de las hojas y flores: destilación por arrastre de vapor, destilación directa y extracción Soxhlet. Por medio de reacciones ácido-base y solubilidad, se aisló el eugenol presente en el aceite esencial. La caracterización del eugenol se realizó por espectroscopía infrarroja. El trabajo computacional consistió en la obtención de los espectros de infrarrojo,

---

<sup>1</sup> Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Químicas, Quito Ecuador. (lmmeneses@puce.edu.ec; juanfrantorero@gmail.com).

utilizando el software Gauss View 4.1.2 y Gaussian 03, para compararlos con los espectros de las diferentes muestras analizadas y del estándar de eugenol. La cantidad de eugenol que se obtuvo de los dos tipos de albahaca está entre un 0,02 y 0,04 % con respecto al peso de albahaca fresca usado en las extracciones. Los espectros de infrarrojos computacional y del estándar tienen una correlación de 99,8 %, mientras que las muestras en promedio tienen una correlación de 96,6 % para la albahaca de sal y 94,1 % la albahaca de dulce, comparadas con el mismo estándar. El método Soxhlet fue el más eficiente para la extracción de eugenol en las muestras de albahaca, aunque resulta ser el menos amigable con el medio ambiente. Los espectros obtenidos tanto experimental como computacionalmente, son comparables con el espectro obtenido del estándar de eugenol, lo que nos indica que tanto el proceso de extracción como los cálculos computacionales fueron adecuados.

## ABSTRACT

The main goal of this work was the isolation and experimental and computational characterization of eugenol in salt basil (*Ocimum basilicum L.*) and sweet basil (*Ocimum americanum*). The extraction of essential oil from the leaves and flowers was performed by three techniques: steam distillation, direct distillation and Soxhlet extraction. By means of acid-base reactions and solubility, eugenol was isolated from other components in the essential oil. The characterization of eugenol was made by infrared spectroscopy. The computational work consisted in the calculation of spectra by using Gauss View 4.1.2. and Gaussian 03 software. The computational spectra were compared with those obtained from the samples and a eugenol's standard. The amount of eugenol obtained from the two types of basil was between 0.02 and 0.04 % as fresh basil weight. Infrared spectra had 99.8 % of correlation between computational and standard spectrum, while samples rendered an average correlation of 96.6 % for salt basil and 94.1% for sweet basil, compared with the same standard. Soxhlet extraction was the best method for obtaining eugenol, although is not environmental friendly. The experimental and computational spectra are comparable with the spectrum of eugenol's standard, which means that the extraction process and computational calculations were appropriate.

## INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de plantas que entran en la descripción general de albahaca, puesto que es una especie que tiene muchos quimiotipos naturales distintos (Damian & Damian, 1995). La importancia de la albahaca en términos generales se debe a su uso en gastronomía y en el campo de la medicina tradicional. Se han realizado estudios que confirman su actividad antibacteriana, antifúngica, analgésica, antiespasmódica, carmitiva, entre otras (Prakash & Gupta, 2005).

El mercado para comercializar la albahaca es muy diverso, ya que su uso se ha difundido a nivel mundial y en diferentes presentaciones, tanto fresca como seca, así como su aceite esencial. Los principales importadores de albahaca son países europeos como Alemania, Francia, Reino Unido y Holanda; en América el principal comprador es Estados Unidos de Norte América (Hiltuner & Holm, 2005).

En nuestro país, la albahaca de sal se la emplea en la gastronomía, mientras que la albahaca de dulce se la

utiliza como parte de la medicina tradicional para baños curativos.

Existe un trabajo de la Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, donde se realizó un estudio *in vitro* de la acción relajante de una infusión al 10 % de *Ocimum basilicum L.* sobre el flíion de rata precontraído con KCl (Rosero *et al.*, 2009). En cuanto a la acción antibiótica, el aceite inhibe el crecimiento del bacilo tuberculoso (Pattnaik & Sitakanta, 1996).

Este estudio se orientó al aislamiento y caracterización de eugenol en la albahaca de sal y de dulce, que se encuentra en los mercados populares de la ciudad de Quito, analizando la albahaca tal como se expende y los compradores la utilizan, sin ningún tipo de tratamiento previo.

La importancia del aislamiento de eugenol se basa en sus usos farmacéuticos. En el caso de la albahaca, la obtención del eugenol es más económica que la tradicional extracción del clavo de olor (*Eugenia caryophyllata*) (Rama *et al.*, 2013).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción del aceite esencial de las hojas y flores de los dos tipos de albahaca, se utilizaron tres métodos: destilación directa por arrastre de vapor; destilación por arrastre de vapor, método vapor vivo; y extracción Soxhlet.

El aislamiento de eugenol se realizó por medio de reacciones ácido-base debido a la naturaleza química de la molécula. La separación del resto de componentes del aceite esencial se realizó en base a la solubilidad de los mismos.

La técnica utilizada para la caracterización de eugenol, fue la espectroscopía, con la que se obtuvo el espectro de cada una de las muestras y su correspondiente duplicado.

### Métodos de extracción

Los métodos empleados para la extracción de aceite esencial de albahaca de sal y de dulce, fueron los siguientes:

### Destilación directa por arrastre de vapor

Se pesaron 40 g de muestra en la balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204, se transfirió la muestra a un balón de base plana de 500 mL con boca esmerilada, se agregaron 250 mL de agua destilada y se sometió al calor en una plancha de calentamiento. Se acopló al balón una trampa Dean-Stark, y sobre esta trampa un condensador simple. Se destiló por 45 minutos (luego de caer la primera gota) y se recolectó el líquido en un embudo de separación de 100 mL, luego se agregó alrededor de 1 g de cloruro de sodio p.a. Merck y 50 mL de hexano p.a. Fisher, se desechó la porción acuosa y se guardó la fase orgánica.

### Extracción Soxhlet

Se pesaron 40 g de muestra en un vaso de precipitación de 100 mL, luego se transfirió la muestra al dedal de celulosa del extractor. En el balón de base redonda de 250 ml que se utilizó para el equipo, se agregaron 130 mL de hexano p.a. Fisher, se dejó en reflujo hasta que el equipo haya sifonado 8 veces.

### ***Destilación por arrastre de vapor, método vapor vivo***

Se pesaron aproximadamente 40 g de muestra en un vaso de precipitación de 100 mL, en la balanza analítica Mettler Toledo modelo AB204 y se transfirió la muestra al balón de base plana de 500 mL. En el otro balón se colocaron 100 mL de agua destilada para generar el vapor vivo y se armó el equipo de destilación. Luego de caer la primera gota se dejó destilar por 45 minutos, el destilado se colectó en un embudo de separación de 100 mL, se agregó alrededor de 1 g de cloruro de sodio p.a. Merck y 50 ml de hexano p.a. Fisher, se desechó la porción acuosa y se guardó la fase orgánica.

### **Aislamiento de eugenol (Ocampo *et. al.*, 2008)**

En un embudo de separación que contiene el solvente con el aceite, se agregaron 25 ml de NaOH al 5 %. Se colectó la fase acuosa y a la fase orgánica se volvió a agregar 25 mL de NaOH al 5%. Se separó la fase acuosa y se mezcló con la porción anterior, y se descartó la fase orgánica. A continuación, a la fracción acuosa se agregaron 50 mL de HCl al 5 % y 30 mL de hexano. Mediante la

utilización de un embudo de separación, se eliminó la fase acuosa y se conservó la fase orgánica, a la que se agregó sulfato de sodio anhidro p.a. Merck. Se transfirió la fase orgánica a un balón de base redonda de 200 mL de boca esmerilada, y se retiró el solvente con ayuda de un equipo de rotaevaporación, el mismo que tiene un baño térmico marca Yamato modelo BM200, control de rotación marca Yamato, modelo RE200. Se dejó rotaevaporar aproximadamente 10 min a una temperatura de 35 °C.

### ***Caracterización de eugenol Espectroscopía infrarroja***

Se realizó la comparación espectral de cada una de las muestras y duplicados, con el estándar de eugenol al 99 % de pureza (Sigma Aldrich). El análisis se realizó en el Espectrofotómetro de Infrarrojos con Transformadas de Fourier FT-IR Perkin Elmer modelo BTXII, de acuerdo con las especificaciones del equipo con un ATR marca Miracle

### **Análisis computacional**

Por medio del software Gauss View 4.1.2 y Gaussian03, se obtuvo el espectro de infrarrojos computacional,

por medio del método B3LYP y la base 6-311g y se comparó con los espectros experimentales. Para ello se optimizó la molécula con el keyword

OPT y luego se obtuvieron los espectros con el keyword FREQ.

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran la cantidad de aceite esencial obtenido en la ex-

tracción por cada método, en los dos tipos de albahaca

**Tabla 1. Pesos promedio de aceite esencial para cada tipo de extracción**

Método de extracción	Peso de Aceite esencial albahaca de sal (g)	Peso de Aceite esencial albahaca de dulce (g)
Arrastre de vapor	0,293	0,277
Destilación directa	0,240	0,234
Soxhlet	0,306	0,299

En la Tabla 2 se encuentra detallado el porcentaje promedio de rendimiento para el aislamiento de eugenol, en los dos tipos de albahaca y con los tres métodos de extracción.

El porcentaje de rendimiento se basa en la cantidad de eugenol obtenido, en base a la cantidad de albahaca fresca tomada como muestra.

**Tabla 2. Porcentaje de rendimiento para el aislamiento de eugenol**

Método de extracción	% Promedio de rendimiento albahaca de sal	% Promedio de rendimiento albahaca de dulce
Arrastre de vapor	0,038±0.001	0,033±0.002
Destilación directa	0,021±0.002	0,020±0.001
Soxhlet	0,042±0.002	0,040±0.001

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) de los tres métodos de extracción utilizados para la albahaca

de sal y para la albahaca de dulce, con un valor de F tabulado al 95 % de confianza.

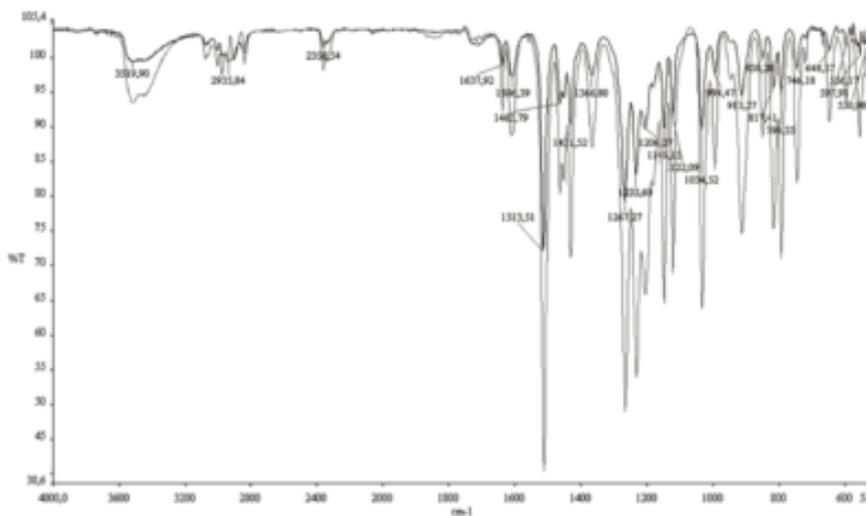
**Tabla 3. Análisis de varianza de los tres métodos de extracción para la albahaca de sal y la albahaca de dulce**

Origen de las varianzas	Grados de libertad	F calculado albahaca de sal	F calculado albahaca de dulce	F tabulado
Entre grupos	2	421,14	505,53	3,35
Dentro de grupos	27			
Total	29			

En la Figura 1, se muestra un espectro de comparación entre el estándar de eugenol (rojo) y una muestra de albahaca de sal (negro), donde se puede

observar las principales bandas y la alta correlación entre los dos espectros.

En la Tabla 4 se aprecia la compara-

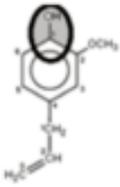
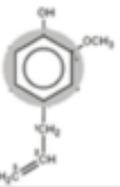
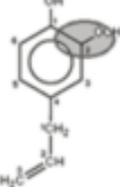
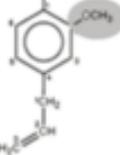
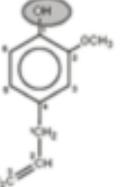


**Figura 1. Espectro infrarrojo de estándar de eugenol comparado con una muestra de albahaca de sal**

ción entre los picos obtenidos computacionalmente y los obtenidos para el estándar de eugenol. La comparación se realizó solamente en los cinco principales picos. Para el estudio comparativo, se utilizaron dife-

rentes métodos y bases de cálculo, a fin de analizar si el cambio de estos parámetros afecta significativamente en el valor de la frecuencia de infrarrojos obtenida.

**Tabla 4. Comparación de principales picos entre espectro experimental del estándar de eugenol y espectros computacionales obtenidos con diferentes bases y métodos**

Método	Pico 1 (cm <sup>-1</sup> )	Pico 2 (cm <sup>-1</sup> )	Pico 3 (cm <sup>-1</sup> )	Pico 4 (cm <sup>-1</sup> )	Pico 5 (cm <sup>-1</sup> )
Estándar	3512,3	1509,33	1265,85	1033,43	556,68
HF 6-3lg	3773,29	1682,26	1292,63	1150,7	722,9
B3LYP 6-3lg	3751,13	1594,29	1247,17	978,96	341,09
B3LYP 6-31lg	3720,22	1576,63	1328,29	1094,17	432,05
Zona de Vibración					
Tipo de vibración	Estiramiento	Estiramiento	Estiramiento	Estiramiento	Tijereteo

## DISCUSIÓN

El aceite esencial obtenido fue incoloro o ligeramente amarillo, con un olor muy agradable, típico de albahaca. Se obtuvieron aproximadamente 0,275 g por 40 g de muestra, es decir, 0,11 % de aceite esencial en promedio. Este valor está dentro del rango citado en la literatura, entre 0,04 % y el 0,7 % para *Ocimum basilicum* L. (Vanaclocha & Cañigueral, 2003).

Los valores de desviación estándar son muy pequeños y similares, tanto

para las muestras, como para los métodos.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los métodos de extracción, aplicados a un mismo tipo de albahaca, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA), ya que con este método estadístico podemos comparar dos o más grupos de datos. El valor de F utilizado para el análisis estadístico tiene una confianza del 95 %. En la Tabla 3 se puede apreciar que existen diferencias significativas

entre los tres métodos, ya que el valor calculado de F tanto para la albahaca de sal como para la albahaca de dulce, es mucho mayor que el valor tabulado. Esto nos indica que las diferencias encontradas no tienen relación con errores aleatorios, sino que dependen únicamente del método.

Las diferencias entre los métodos pueden deberse al uso del solvente para la extracción, ya que el solvente orgánico permite extraer una mayor cantidad de compuestos adicionales al aceite esencial, como por ejemplo pigmentos, que podrían aumentar la cantidad final de extracto.

Para la caracterización del eugenol se utilizó como técnica principal la espectrofotometría infrarroja, utilizando un estándar de eugenol para comparar su espectro con los obtenidos de las muestras, y de esta manera asegurar que los productos del aislamiento son efectivamente eugenol. Previo a la comparación con el estándar, se

consideró cuáles son los picos importantes que deben estar presentes en el espectro, debido a la estructura de la molécula. Por ejemplo, el pico del grupo OH presente en la molécula, tiene una banda característica que aparece entre  $3400$  y  $3650\text{ cm}^{-1}$ , otro pico importante es uno del anillo aromático del eugenol que aparece entre  $1450$  y  $1600\text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros de muestras y duplicados tuvieron una correlación mayor al 90 %, lo que confirma la presencia de eugenol en las extracciones. La correlación se obtuvo por superposición de espectros en el equipo, como se observa en la Figura 1.

La comparación del espectro computacional se realizó tomando en consideración cinco picos principales, y en base a éstos, se obtuvo una correlación del 99,8 %, dejando en evidencia la utilidad del uso del modelamiento computacional.

## CONCLUSIONES

La caracterización del eugenol obtenido de las muestras de albahaca, permite confirmar que el método de

aislamiento de este compuesto, utilizado para su extracción de clavo de olor, es adecuado también para la al-

bahaca, debido a que se obtuvieron espectros bien definidos y contrastables con el estándar, sin tener mayores variaciones entre ellos.

Se demostró que los espectros computacionales pueden servir de guía para el estudio propuesto, incluso podrían ser utilizados para la caracterización, debido a que la diferencia entre éstos y el espectro obtenido instrumentalmente de un estándar, es poco significativa.

La extracción de aceite esencial mediante arrastre de vapor, método vapor vivo, resultó ser el método más adecuado, tomando en consideración dos aspectos, primero el rendi-

miento promedio que fue de 0,03 %, y segundo, la cantidad de solvente necesario al final del proceso de extracción y aislamiento, que fue mucho menor que el de extracción Soxhlet.

El método de extracción Soxhlet presentó un promedio de rendimiento del 0,04 %, superior a las dos extracciones acuosas, pero la cantidad de solvente utilizado hasta el final del proceso es muy alta, llegando a usarse 160 mL de hexano por muestra, lo que no es amigable con el medio ambiente.

## LITERATURA CITADA

- Damian, P., Damian, K. (1995). *Aroma-therapy: scent and psyche*, Healing Arts Press, Vermont, USA.
- Hiltuner, R., Holm, Y. (2005). *Basil the genus Ocimum*, Overseas Publishers Association, Amsterdam, Netherland.
- Ocampo, R., Ríos, L., Betancur, L., Ocampo, D. (2008). *Curso práctico de Química Orgánica. Enfocado a Biología y Alimentos*, Editorial Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- Pattnaik, Sitakanta, C. (1996). *In vitro propagation of the medicinal herbs Ocimum americanum L. syn. O. canum Sims. (hoary basil) and Ocimum sanctum L. (holy basil)*, Plant Cell Reports, 15(11), pp.846-850.
- Prakash, P., Gupta, N. (2005). *Therapeutic uses of Ocimum sanctum linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review*, Indian J Physiol Pharmacol, 49 (2), pp. 125-131.
- Rama, M., Sundar, Syama, B. (2013). *Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of Ocimum sanctum green and purple*, International Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2 (2), pp. 55-65.
- Rosero, C., Camacho, R., Polanco, M., Gómez, S. (2009). *Efecto relajante de las hojas de Ocimum basilicum y Foeniculum vulgare colombianas en ílion aislado de rata*, Univ. Med., Colombia, 50 (1), pp. 98-109.
- Vanaclocha, B., Cañigueral, S.,(2003). *Fitoterapia Vademécum de prescripción*, Elsevier, Barcelona, España.