

Variabilidad química del “tomillo silvestre” (*Acantholippia seriphioides*, Verbenaceae) en la meseta Patagónica

[Chemical Variability of “tomillo silvestre” (*Acantholippia seriphioides*, Verbenaceae) in the Patagonian Plateau]

Silvia B Gonzalez¹, Pedro E Guerra¹, Catalina van Baren², Paola Di Leo Lira²,
Daiana Retta² & Arnaldo L Bandoni²

¹Facultad de Ciencias Naturales y Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Sarmiento 849,
Esquel, Provincia de Chubut, Argentina.

²Cátedra de Farmacognosia-IQUIMEFA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires-CONICET,
Buenos Aires, Argentina.

Contactos / Contacts: Silvia B GONZALEZ - E-mail address: quim-esq@unpata.edu.ar

Abstract: “Tomillo silvestre” is a widespread medicinal and aromatic plant with medicinal and flavoring uses in numerous regions of Argentina. *Acantholippia seriphioides* populations from two areas of the Chubut’s plateau: El Pajarito and La Rueda, have been studied. The dried aerial parts were extracted by hydrodistillation and the essential oils were analyzed by GC/FID/MS. The average yields of oils were 5.2 ml/kg and 3.2 ml/kg for La Rueda and El Pajarito, respectively. The chemical profiles found were: γ -terpinene/thymol/carvacrol in La Rueda and myrtenol/geraniol/carvone in El Pajarito. The feasible chemotype from the latter area is significantly different from those previously reported for this species, and it also showed an important quantitative variation according to the phenological stages.

Keywords: *Acantholippia seriphioides*, essential oils, chemotyped, Patagonia Argentina

Resumen: El tomillo silvestre es una planta aromática y medicinal de amplio uso en varias regiones de Argentina como medicinal y saborizante. Se estudiaron poblaciones de *Acantholippia seriphioides* en dos zonas de la meseta chubutense, los parajes El Pajarito y La Rueda. Las partes aéreas oreadas fueron extraídas por hidrodestilación y los aceites esenciales se analizaron por GC-FID-MS. Los rendimientos en promedio de aceites esenciales fueron de 5.2 ml/kg y 3.2 ml/kg, para La Rueda y El Pajarito respectivamente. Los tipos químicos encontrados fueron: γ -terpineno/timol/carvacrol en La Rueda y mirtenol/geraniol/carvona en El Pajarito. El probable quimiotipo de este último sitio difiere marcadamente de los reportados en trabajos previos para esta especie y presenta además importante variabilidad cuantitativa, según el estado fenológico.

Palabras clave: *Acantholippia seriphioides*, aceites esenciales, quimiotipos, Patagonia Argentina

Recibido | Received: 20 de Junio de 2015

Aceptado | Accepted: 3 de Octubre de 2015

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 29 de Noviembre de 2015

Publicado en línea | Published online: 31 de enero de 2016.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Se agradece a la Universidad de Buenos Aires (proyectos UBACYT 20020130100169BA y 20020130200057BA) y a la Facultad de Ciencias Naturales UNPSJB sede Esquel, por el financiamiento de este trabajo.

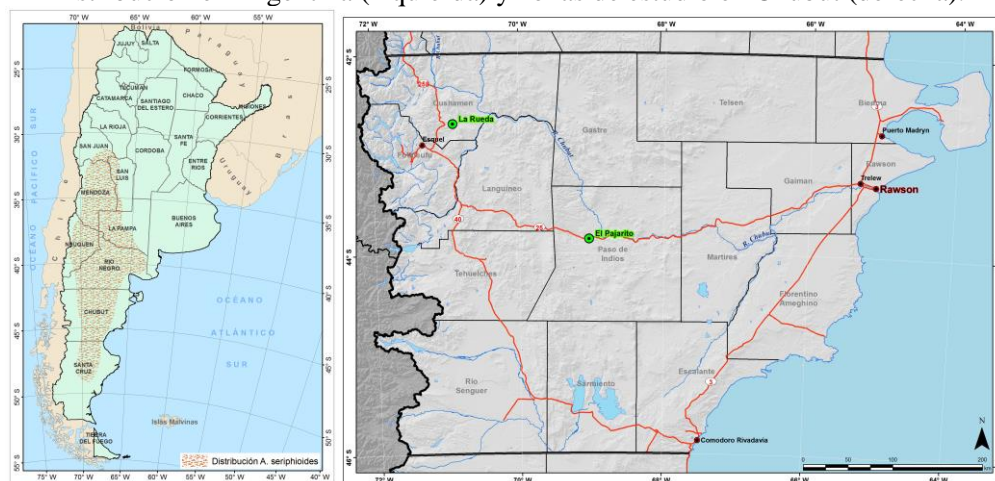
Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: SB Gonzalez, PE Guerra, C van Baren, P Di Leo Lira, D Retta, AL Bandoni. 2016. Variabilidad química del “tomillo silvestre” (*Acantholippia seriphioides*, Verbenaceae) en la meseta Patagónica. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 15 (1): 61 – 68.

INTRODUCCIÓN

Acantholippia seriphioides (a. gray) moldenke (sinónimos: *Lippia seriphioides* A. Gray; *Lippia foliosa* Phil.) (Zuloaga & Morrone, 1999) es un arbusto de 0,30-0,60 m, postrado, con ramas espinescentes, que se encuentra en zonas áridas de las Provincias de San Juan, Mendoza, San Luis, La Pampa, Neuquén, Chubut y Santa Cruz (Figura 1). conocida popularmente como “tomillo silvestre” “tomillo del campo” “ñancuñan”, “tomillo”, “tomillo macho” o “tomillo mendocino”, es una planta aromática de amplio uso en varias regiones de la Argentina, muy apreciada por los pobladores locales como medicinal y saborizante, en forma similar al

tomillo europeo (*Thymus vulgaris* L.). se lo usa en infusión o agregado al mate para trastornos gastrointestinales y para condimentar carnes. Se ha determinado el poder antioxidante y conservante de su aceite esencial en hamburguesas comerciales de carne vacuna, conservadas a 4 ± 0.5 °C, donde se encontró que bajo las condiciones del ensayo, la adición de dosis de 150 mg/kg de aceite esencial de tomillo mendocino, envasadas bajo vacío y atmósfera modificada, tiene efecto antioxidante pero no efecto conservante (Medina de Dias *et al.*, 2003). También fue demostrada su actividad contra enfermedades típicas en apicultura (Fuselli *et al.*, 2006; Fuselli *et al.*, 2007).

Figura 1
Distribución en Argentina (izquierda) y zonas de estudio en Chubut (derecha).



A semejanza de *T. vulgaris*, el aceite esencial de *A. seriphioides* presenta según el sitio donde crece gran variabilidad en cuanto a su composición química, lo que permite suponer la presencia de distintos quimiotipos. Varios trabajos publicados caracterizaron muy distintos perfiles aromáticos, los que desde el punto de vista biosintético se pueden resumir en:

1. Ruta del gamma terpineno - *p*-cimeno - timol - carvacrol. Es la variedad más común y difundida; por lo tanto la más conocida. Se la encuentra desde Mendoza, San Juan y Córdoba hasta Chubut (Ruffinengo *et al.*, 2005; Gillij *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011; Mazzuca *et al.*, 2015; van Baren *et al.*, 2015).
2. Ruta del geraniol - linalol, en la provincia de Mendoza, pero con baja incidencia entre las poblaciones naturales (van Baren *et al.*, 2015).

3. Ruta del limoneno - carveol - carvona - *cis* y *trans* dihidrocarvona, también en la provincia de Mendoza (van Baren *et al.*, 2015).

El objetivo de este trabajo fue analizar la composición química de los aceites esenciales de “tomillo de campo” cosechados en poblaciones naturales de la provincia de Chubut, algunas de ellas con notables diferencias olfativas respecto de las ya conocidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron en este trabajo dos poblaciones de *A. seriphioides* en la zona de la meseta chubutense, El Pajarito (43.86° L.S. y 69.04° L.O.) y La Rueda (42.7° L.S. y 70.5° L.O.). Se obtuvieron muestras (aprox. 250 gramos) en distintos estadios fenológicos: floración y vegetativo. El material vegetal de El Pajarito fue identificado por la Lic.

María Elena Arce y un ejemplar ha sido depositado en el Herbario Regional Patagónico, bajo el número HRP 6766 (El Pajarito) y el de La Rueda por el Ing. Pedro Guerra y una muestra de herbario se conserva con el número BF 052. La fracción volátil de cada muestra fue obtenida por hidrodestilación (3 horas) del material oreado con trampa tipo Clevenger como la descrita en la Farmacopea Argentina en su séptima Edición (2007). Se calcularon los rendimientos en ml de aceite esencial/kg de material desecado. El aceite esencial se analizó por CG-FID-MS, empleando un equipo Perkin Elmer GC modelo Clarus 500 con una configuración especial (Retta *et al.*, 2008). El mismo está provisto de un muestreador automático Autosampler conectado a un único inyector tipo *split* (relación de *split*: 1:100) conectado mediante un divisor de flujos a dos columnas capilares de sílice fundido: a) polietilenglicol de PM aprox. 20.000 y b) 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, ambas de 60 m x 0,25 mm de diámetro y 25 µm de espesor de fase estacionaria. La columna polar está conectada a un detector FID mientras que la columna no polar está conectada a un detector FID y a un detector de masas cuadrupolar (70 eV), a través de un sistema de venteo (MSVent™). Fase móvil: Helio a 1,87 ml/min. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas: 90 °C,

luego a 3°/min hasta los 225 °C (15 min). Temperaturas del inyector y ambos detectores FID: 255 °C y 275 °C, respectivamente. Cantidad inyectada: 0,2 µl de una dilución al 10% en etanol. Temperatura de la línea de transferencia: 180 °C. Temperatura de la fuente de iones: 150 °C. Rango de masas escaneado: 40-300 m/z. La configuración del equipamiento utilizado permitió obtener a partir de una única inyección de la muestra los siguientes datos:

1. índices de retención de los compuestos calculados con una serie homóloga de alcanos (C₆ a C₂₄) en la columna polar y en la columna no polar;
2. espectros de masa de cada uno de los compuestos separados en la columna no polar.

La identificación de cada uno de los compuestos se realizó por comparación de los índices de retención obtenidos en las dos columnas de distinta polaridad, con los que se obtuvieron a partir de muestras auténticas o con los que figuran en bibliografía, junto a la comparación de los espectros de masa obtenidos con los que figuran en nuestra base de datos y otras comerciales (Adams, 2007; NIST, 2008).

Tabla 1
Composición química de las muestras obtenidas en El Pajarito.

Compuesto	El Pajarito					
	floración		LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴
	prefloración	Área%				
tuyeno alfa	0.2	0.1	929	924	1036	1027
etilo, tiglato de *	0.1		937	929	¿?	1231 ^a
pineno alfa	9.4	6.4	945	932	1043	1025
Canfeno	0.1	0.1	951	946	1100	1069
tuya-2,4(10)-dieno		0.1	960	953	1143	1122
sabineno	0.1		985	969	1138	1122
mirceno	1.2	0.9	992	988	1170	1161
pineno beta	0.3	0.3	994	974	1133	1110
terpineno alfa	0.6	0.3	1010	1014	1206	1178
p-cimeno	10.5	10.6	1015	1020	1286	1270
Limoneno	8.0	6.4	1024	1024	1221	1198
felandreno beta	0.9	0.7	1042	1025	1227	1209
ocimeno <i>cis</i> beta		1.7	1047	1032	1235	1235
terpineno gamma	3.3	1.4	1051	1054	1264	1245
linalol	1.0	0.1	1090	1095	1549	1543
canfolenal alfa		0.2	1138	1122	1507	1496
p-menta-2,8-dien-1-ol, <i>trans</i>	0.1	0.2	1140	1119	1674	1639

óxido de limoneno <i>trans</i> (Me vs. IPP)	0.2		1149	1137	1478	1462
Citronelal	2.7	0.8	1157	1148	1491	1475
verbenol <i>cis</i>		0.1	1158	1137	1663	1660
pinocarveol <i>trans</i>	0.3		1160	1135	1663	1661
verbenol <i>trans</i>	1.2	1.5	1168	1140	1685	1680
isopulegol	0.3		1170	1145	1583	1573 ^a
tuyanól neo-3 *		0.3	1172	1149	1581	1573 ^a
3-acetoxi-4-(1-hidroxi-1-metiletil)-1-metil ciclohexeno *	0.2	0.2	1175	-	¿?	
iso isopulegol	0.1	0.1	1178	1155	1635	1585 ^a
p-menta-1,5-dien-8-ol	0.3	0.3	1180	1166	1729	1738 ^a
isoborneol	0.1	0.2	1182	1155	1677	1659
terpinen-4-ol	0.5	0.6	1197	1174	1614	1601
p-cimen-8-ol			1199	1179	1855	1848
terpineol alfa	0.2	0.2	1211	1186	1705	1694
Mirtenol	9.1	13.2	1220	1194	1796	1790
dihidrocarvona <i>trans</i>	3.3	5.3	1226	1200	1642	1623
carveol <i>trans</i>	1.9	3.8	1235	1215	1838	1836
timil metil éter	1.0		1234	1232	1604	1587
Citronelol	0.2		1233	1223	1770	1764
p-menta-1(7),8-dien-2-ol <i>cis</i>		0.2	1235	1227	1892	1895
Neral	1.7	2.7	1247	1235	1692	1679
geraniol	1.2	10.3	1249	1249	1852	1839
Carvona	15.2	6.1	1240	1239	1745	1734
geranial	2.1	3.4	1277	1264	1740	1725
mirtanol <i>cis</i>	0.1	0.7	1252	1250	¿?	1861 ^a
timol	7.4	3.4	1291	1289	2195	2164
p-cimen-7-ol	0.2		1292	1289	2104	2101
Carvacrol	0.5	2.9	1293	1298	2216	2211
citronélico, ácido *	2.4	2.8	1308	1312	1746	¿?
metilo, geraniato de		0.2	1322	1322	1699	1688
mirtenilo, acetato de	3.8	4.8	1335	1324	1697	1692
carvilo, acetato de, <i>trans</i>	0.9	1.2	1340	1339	1781	1775
citronelilo, acetato de	2.5	1.4	1355	1350	1666	1657
nerilo, acetato de	0.8	0.3	1362	1359	1729	1718
timilo, acetato de		0.5	1363	1349	1854	1867
carvacrilo, acetato de		0.1	1371	1370	2216	2211
geranilo, acetato de		0.8	1375	1379	1760	1751
copaeno alfa	0.1		1377	1374	1511	1491
mirtanilo, acetato <i>trans</i> *	0.2	0.4	1379	1385	¿?	1746 ^a
bourboneno beta	0.3		1400	1387	1537	1523
cariofileno <i>cis</i>	0.1	0.2	1405	1408	1591	1588
cubebeno beta	2.5		1406	1387	1545	1542
germacreno D	0.3		1498	1484	1721	1708
biciclogermacreno	0.2		1512	1500	1742	1735

amorfeno delta	0.1		1520	1511	1740	1726 ^a
farneseno <i>trans trans</i> alfa	0.1		1521	1505	1754	1744
Espatulenol	0.2	0.6	1599	1577	2125	2127
óxido de cariofileno	0.1	0.3	1605	1582	1989	1986
Total	99.5	99.2				

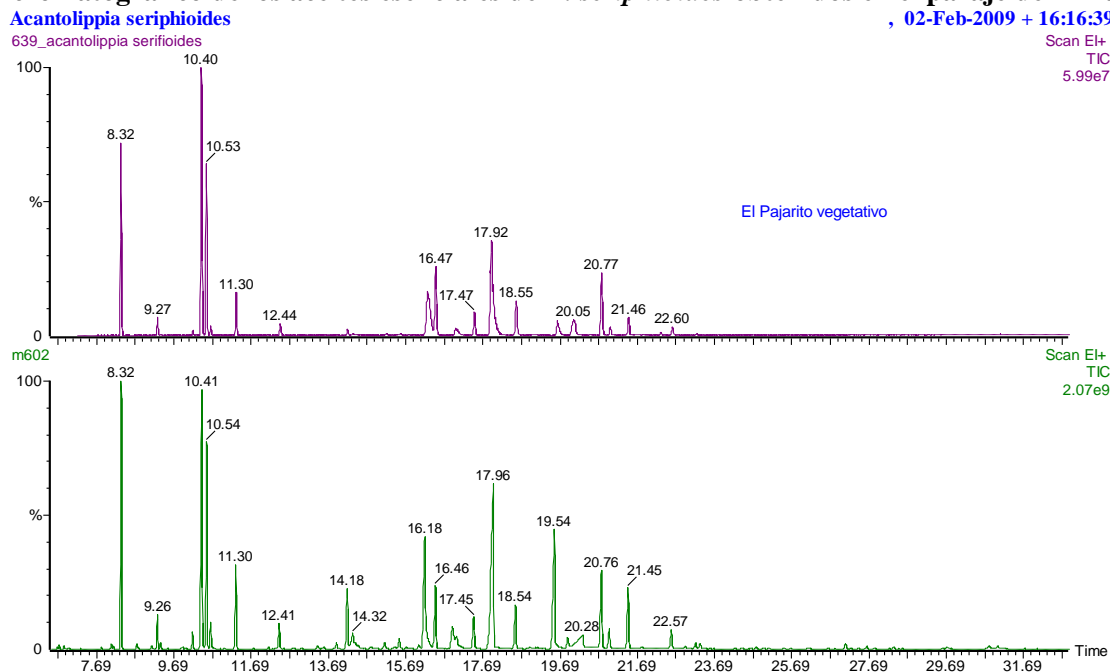
Ordenados según la elución en la columna no polar. *: Tentativamente identificado. LRI¹: Índices de retención lineales experimentales en columna no polar. LRI²: Índices de retención lineales en columna no polar según Adams (2007). LRI³: Índices de retención lineales experimentales en columna polar. LRI⁴: Índices de retención lineales en columna polar (Babushok *et al.*, 2011; ^aThe Wiley/NBS spectral library).

Tabla 2
Composición química de las muestras obtenidas en La Rueda.

Compuesto	La Rueda		LRI ¹	LRI ²	LRI ³	LRI ⁴
	pre-floración	post-floración				
	Área%					
tuyeno alfa	0.3	0.1	929	924	1036	1027
pineno alfa	0.3	0.4	945	932	1043	1025
Sabineno	0.3	-	985	969	1138	1122
Mirceno	0.9	1.5	992	988	1170	1161
pineno beta	0.7	0.2	994	974	1133	1110
careno delta-3	0.7		1009	1008	1175	1147
terpineno alfa	1.0	1.0	1010	1014	1206	1178
p-cimeno	8.9	20.8	1015	1020	1286	1270
Limoneno	0.5	0.7	1024	1024	1221	1198
felandreno beta	0.3	0.2	1042	1025	1227	1209
terpineno gamma	5.6	6.7	1051	1054	1264	1245
p-menta-2,4(8)-dieno *	0.5	0.1	1075	1085	¿?	¿?
terpinen-4-ol	1.9	1.3	1197	1174	1614	1601
metil chavicol	1.8		1200	1195	1684	1671
mirtenol		0.4	1202	1194	1796	1790
Geraniol		0.5	1249	1249	1852	1839
Timol	42.3	48.4	1290	1289	2195	2164
Carvacrol	24.4	15.0	1293	1298	2216	2211
timilo, acetato de	3.5		1363	1349	1854	1867
carvacrilo, acetato de	3.7		1371	1370	1878	1880
geranilo, acetato de	1.7		1375	1379	1760	1751
cariofileno <i>cis</i>			1405	1408	1591	1588
viridifloreno		0.1	1496	1496	1707	1696
Total	98.9	97.4				

Ordenados según la elución en la columna no polar. *: Tentativamente identificado. LRI¹: Índices de retención lineales experimentales en columna no polar. LRI²: Índices de retención lineales en columna no polar según Adams (2007). LRI³: Índices de retención lineales experimentales en columna polar. LRI⁴: Índices de retención lineales en columna polar (Babushok *et al.*, 2011).

Figura 2
Perfil cromatográfico de los aceites esenciales de *A. seriphoides* obtenidos en el paraje de El Pajarito



La cuantificación se realizó a partir de las respuestas de los detectores FID en ambas columnas por el método de porcentaje de áreas, sin corrección por diferencias de respuesta. Se tomó para cada componente la menor respuesta obtenida entre las correspondientes a las dos columnas utilizadas.

RESULTADOS

El rendimiento de aceite esencial fue en promedio de 5.2 ml/kg en las muestras de La Rueda y 3.2 ml/kg en las de El Pajarito. Se analizaron los estadios fenológicos de floración y prefloración para el sitio El Pajarito. Se encontró gran variabilidad en los porcentajes de algunos componentes principales como el geraniol y la carvona, invirtiéndose sus porcentajes, según la etapa (Tabla 1 y 2; Figura 2). Para el sitio La Rueda se estudiaron los contenidos de aceites esenciales en pre y postfloración, encontrándose también variación en los compuestos mayoritarios: *p*-cimeno y carvacrol.

DISCUSIÓN

El “tomillo del campo” es muy apreciado por los pobladores de la Patagonia. Prueba de ello es que en uno de los sitios donde los lugareños cosechan estas plantas, nos enseñaron cómo se debe proceder para su

recolección y uso, demostrando un gran respeto y compenetración con el mundo vegetal y la naturaleza en general. En la localidad de Gualjaina (sitio La Rueda), Gonzalo Cabrera Huincaleo, un niño de 12 años de etnia mapuche, nos acompañó en una oportunidad para buscar esta planta y nos comentó que siempre hay que pedir permiso para cortarlas: “**wuni newen kalfuwenucha wenu ñuke feley**”. Sin embargo, no es muy conocida la existencia de plantas con características organolépticas tan diferentes, al menos entre los habitantes que conocen y utilizan la planta, probablemente porque parece ser más abundante el tipo químico timol - carvacrol.

En este trabajo se ha encontrado lo que sería una cuarta ruta biosintética para la especie (Figura 3 y 4): alfa pineno - mirtenol, por el predominio de estos terpenos en la composición de los volátiles y no haberse reportado la presencia de mirtenol en otros trabajos. Como esta variedad también contiene geraniol y citral (neral + geranial), es probable que se corresponda con la variedad inicialmente citada por Fester (1958), quien comenta que “en el sur de Mendoza y Neuquén existe una variedad con algo de citral y geraniol, a la que los lugareños llaman “tomillo macho”.

Figura 3
Relación biosintética de γ -terpineno y *p*-cimeno con timol y carvacrol.

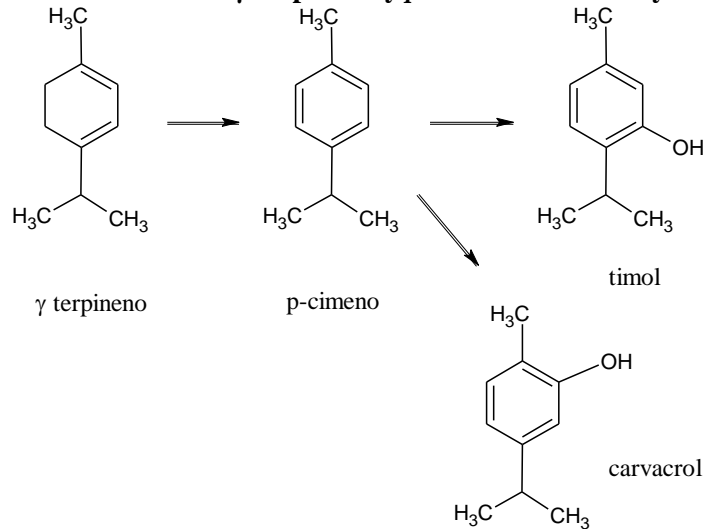
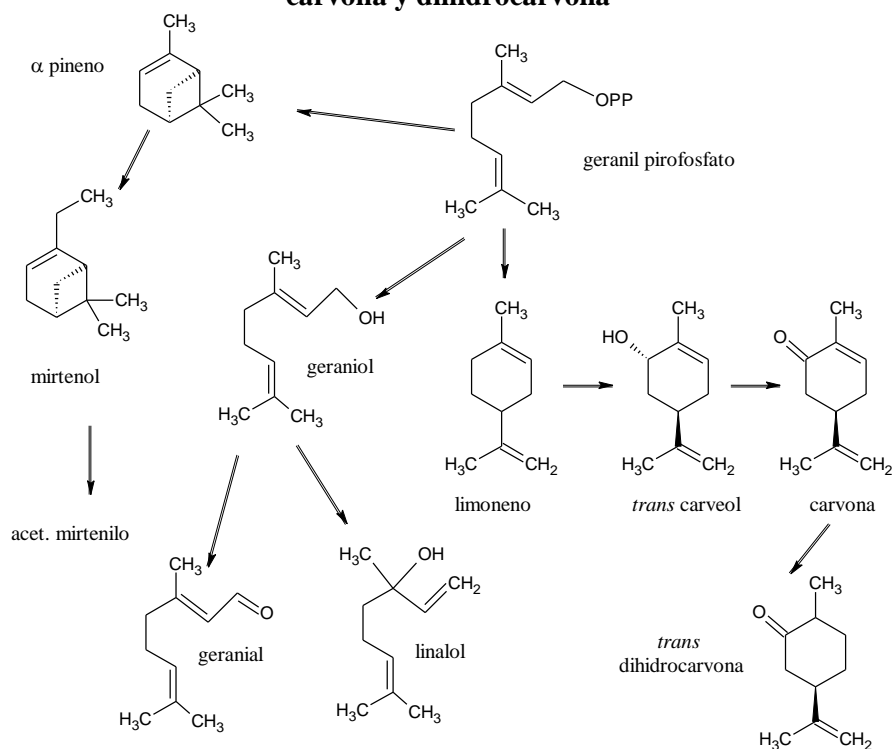


Figura 4
Relaciones biosintéticas de α pineno con mirtenol, geraniol con linalol y citral y limoneno con carveol, carvona y dihidrocarvona



CONCLUSIONES

El sitio El Pajarito presentó una composición de aceite esencial de *A. seriphoides* muy diferente al sitio La Rueda, a pesar de que las condiciones edafoclimáticas generales son similares en ambos sitios. Difiere también marcadamente a los reportados en trabajos previos, identificándose en este caso

terpenos como mirtenol y acetato de mirtenilo en significativa cantidad, cuyas existencias en otras muestras no fueron detectadas. Este material sería el que Fester (1958) identificó por su contenido en geraniol y citral y constituiría un nuevo quimiotipo dentro de la especie. Resulta conveniente continuar con el estudio de la composición química de estos

aceites esenciales obtenidos en diferentes estados fenológicos y cultivando las distintas variedades en un mismo lugar durante más de un ciclo evolutivo, para poder establecer si las diferencias encontradas en los distintos trabajos corresponden a quimiotipos diferenciales, o si las variaciones detectadas son expresiones de la adecuación al medio y las condiciones climáticas en que se desarrollaron.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Buenos Aires (proyectos UBACYT 20020130100169BA y 20020130200057BA) y a la Facultad de Ciencias Naturales UNPSJB sede Esquel, por el financiamiento de este trabajo. Un especial agradecimiento al Lic. Bruno Gastaldi, al Ing. Forestal Diego Mohr Bell Coordinador del Área de Geomática del Centro de Investigación y Extensión Andino Patagónico (CIEFAP) por la confección de los mapas y al joven Gonzalo Cabrera Huincaleo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, RP. 2007. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4th Ed, Allured, Carol Stream, IL, USA.
- Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG. 2011. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. **J Phys Chem** 40: 1- 47.
- Farmacopea Argentina**, 7^o edición. 2007. Ed. ANMAT, Buenos Aires, Argentina.
- Fester GA. 1958. Particularidades de esencias aromáticas argentinas. **Miscelánea** 38: 11 - 18.
- Fuselli SR, García de la Rosa SB, Gende LB, Eguaras MJ, Fritz R. 2006. Antimicrobial activity of some Argentinian wild plants essential oils, against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American Foulbrood (AFB). **J Apicult Res Bee World** 45: 2 - 7.
- Fuselli SR, García de la Rosa SB, Eguaras MJ, Fritz M, Mndagijimana M, Vannini L, Guerzoni ME. 2007. Efficacy of indigenous plant essential oil Andean thyme *Acantholippia seriphioides* A. Gray) to control american foulbrood (AFB) in honey bee (*Apis mellifera* L.) Hives. **J Essent Oil Res** 19: 514 - 519.
- Gillij YG, Gleiser RM, Zygadlo JA. 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresour Technol** 99: 2507 - 2515.
- Lima B, López S, Luna L, Agüero MB, Aragón L, Tapia A, Zacchino S, López ML, Zygadlo J, Feresin GE. 2011. Essential oils of medicinal plants from the Central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. **Chem Biodiversity** 8: 924 - 936.
- Mazzuca M, Berezosky J, Cerdá RC, Arce ME, van Baren C, Di Leo Lira P, Bandoni A. 2011. Chemical composition and bioactivity of *Acantholippia seriphioides* essential oils from the Patagonia. **J Essent Oil Res** 23: 26 - 31.
- Medina de Dias R, Zimmermann M, Dupertuis L, Espejo C, Amadio C, Raimondo E, Dip G. 2003. Aceite esencial de tomillo como antioxidante y conservador en hamburguesas funcionales. **Rev Fac Cienc Agr UNCuyo** 35: 13 - 23.
- NIST, 2008. **NBS registry of mass spectral data**. J. Wiley & Sons, Inc. Nueva York, USA.
- Retta D, Gattuso M, Gattuso S, Di Leo Lira P, van Baren C, Ferraro G, Bandoni AL. 2008. Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (Asteraceae) from different locations of Argentina. **Biochem Syst Ecol** 36: 877 - 881.
- Ruffinengo SA, Eguaras MB, Floris IC, Faverin CD, Bailac PE, Ponzi ME. 2005. LD₅₀ and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. **J Econ Entomol** 98: 651 - 655.
- van Baren CM, Elechosa MA, Di Leo Lira P, Retta D, Juárez MA, Martínez A, Molina AN, Bandoni AL. 2015. *Acantholippia seriphioides*: Biodiversidad química de poblaciones naturales de la región de Cuyo de la Argentina. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 14: 33 - 41.
- Zuloaga FO, Morrone O. 1999. **Catálogo de plantas vasculares de la República Argentina**. Missouri Botanical Garden Press, Missouri, USA.