

# Caracterización de Especies de *Tilia* mediante Perfiles Cromatográficos en Fase Gaseosa de los Componentes Volátiles Extraídos del Vapor en Equilibrio con el Material Vegetal ("Headspace Analysis")

Gabriela SALA, Eloy MANDRILE y Lázaro F.R. CAFFERATA

Laboratorio de Farmacognosia y Cátedra de Química Orgánica I,  
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,  
Calles 47 esq. 115, (1900) La Plata, Argentina

---

**RESUMEN.** Se han estudiado los componentes volátiles de brácteas y flores de 3 especies de *Tilia* (Tilo), por cromatografía gaseosa, utilizando una columna rellena con "Porapak Q" a fin de contribuir a su caracterización quimiotaxonómica. Se compararon las eficiencias relativas de los métodos de extracción de compuestos volátiles: destilación por arrastre con vapor de agua, destilación a presión reducida y de muestreo estático de la cámara ocupada por el vapor en equilibrio con el material a 80 °C ("Headspace Analysis", HSA). La técnica HSA es la que ofrece las mayores ventajas para diferenciar y caracterizar especies vegetales por medio del análisis por cromatografía gaseosa de sus componentes volátiles.

**SUMMARY.** "Characterization of *Tilia* Species through Gas Chromatographic ("Headspace Analysis") Profiles of the Volatile Components Extracted from the Vapor in Equilibrium with the Plant Material". The volatile compounds of bracts and flowers of three species of *Tilia* ("linden") have been studied by gas chromatographic using a packed column of "Porapak Q", to contribute to following methods of extraction of volatile compound were evaluated: steam distillation, low pressure distillation and static Headspace Analysis (HSA). The HSA technique is the most suitable to differentiate and characterize plant species through gas chromatographic analysis of their volatile components.

---

## INTRODUCCION

La clasificación quimiotaxonómica de los vegetales en base a los principios activos mayoritarios ha demostrado tener algunos inconvenientes <sup>1</sup> lo que ha obligado a considerar otras características distintivas, especialmente cuando se trata de plantas que poseen componentes volátiles y muchas veces con propiedades farmacológicas importantes. Por otra parte la aplicación de métodos instrumentales muy sensibles, rápidos y específicos al análisis de los productos naturales tiene la ventaja de poder verificar su autenticidad y, en consecuencia, la calidad comercial de los mismos.

**PALABRAS CLAVE:** *Tilia spp*; Esencia de Tilo; Cromatografía gaseosa; HSA; Caracterización quimiotaxonómica.

**KEY WORDS:** *Tilia*; Linden essential oil; Gas chromatography; Static Headspace Analysis; Chemotaxonomic characterization.

En la actualidad la quimiotaxonomía vegetal hace uso de muy diversas metodologías analíticas <sup>2,4</sup>, con las que se ha llegado a determinar la época de recolección del material estudiado o aún hasta su ubicación geográfica <sup>5</sup>. Entre los estudios quimiotaxonómicos más recientes efectuados en nuestro medio puede mencionarse el que emplea la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para analizar los flavonoides presentes en diferentes especies vegetales autóctonas <sup>6</sup>.

*Tilia* es un género muy difundido en nuestro país, cuyas especies poseen flores y brácteas utilizadas en medicina popular por sus propiedades sedantes y diuréticas, aplicadas incluso en el tratamiento de la aterosclerosis <sup>7-11</sup>. El análisis realizado por cromatografía gaseosa del aceite esencial de tilo, obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua, revela la presencia de alrededor de 50 picos cromatográficos correspondientes a diversos tipos de compuestos, la mayoría de ellos identificados por espectrometría de masa <sup>12</sup>. La composición química de la esencia proveniente de la extracción (con anhídrido carbonico líquido) de las flores de *Tilia cordata* Mill. incluye hidrocarburos, monoterpenos, flavonoides y ésteres <sup>13</sup>. Por otra parte, por HPLC se han podido también determinar los componentes químicos de distintos órganos de esa misma especie <sup>14</sup>. También se ha utilizado la cromatografía plana (en capa delgada y papel) en la caracterización e identificación de algunos componentes de la esencia de tilo <sup>15</sup>. Sin embargo, no se dispone de información relativa al análisis de los componentes más volátiles del tilo que son los principales responsables de su aroma, ya sea con el objetivo de la diferenciación taxonómica o de la determinación del control de calidad de las brácteas y flores de las distintas especies.

En este trabajo se ha aplicado la técnica de cromatografía gaseosa llevada a cabo con una columna rellena con un polímero poroso ("Porapak Q") –material adecuado para muestras que contienen vapor de agua– para el análisis de mezclas de componentes volátiles obtenidos por diferentes métodos de extracción (destilación por arrastre con vapor, destilación molecular a presión reducida y HSA), de flores y brácteas de 3 especies de *Tilia* muy difundidas en nuestro país, con el fin de efectuar un aporte quimiotaxonómico y al mismo tiempo proponer una metodología analítica que permita efectuar el control de calidad de esos órganos del vegetal por el contenido de sus principios volátiles.

## **MATERIAL Y METODOS**

### ***Material vegetal***

Se utilizaron flores y brácteas de *Tilia cordata* Mill. recogidas en el área de la ciudad de La Plata en la época de su floración (noviembre de 1991), mantenidas a temperatura ambiente en recipientes de vidrio herméticos por periodos cortos (1-2 días), antes de ser convenientemente molidas para su análisis. También se empleó material desecado de la misma especie y de *Tilia americana* L. moltkei (Dippel) Xifreda y de *Tilia tomentosa* Moench, recolectadas en noviembre de 1990 y desecadas a temperatura ambiente.

### ***Métodos de extracción de componentes volátiles***

Se emplearon los siguientes métodos de extracción de los componentes volátiles del material estudiado:

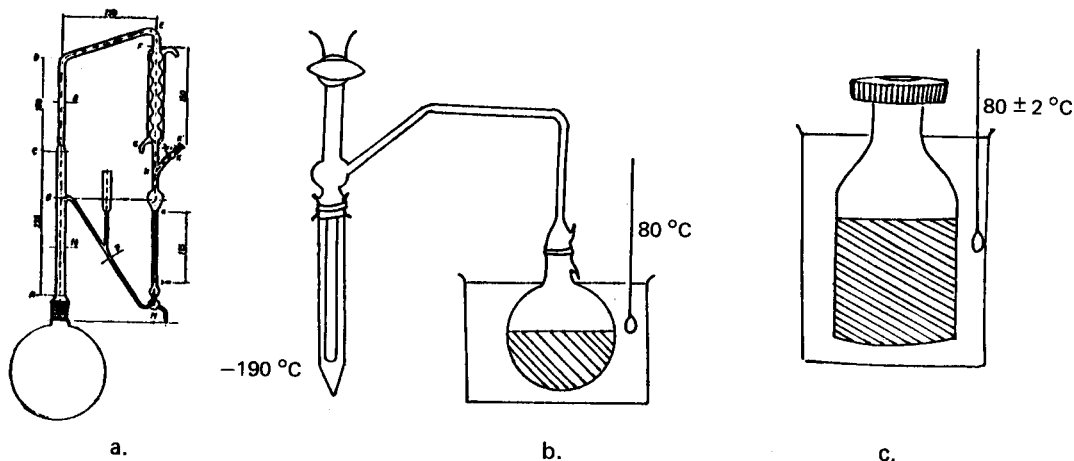
a) Aislamiento por destilación por arrastre con vapor de agua (Fig. 1a)

Para su funcionamiento se adicionó benceno como solvente auxiliar (1 ml) y aceite de silicona (Dow-Corning) como antiespumante (0,2 ml). El tiempo de la destilación fue de alrededor de 1 h, decantandose finalmente la capa orgánica obtenida por centrifugación.

b) Aislamiento por destilación a presión reducida con recolección a  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$  ("destilación molecular").

El material estudiado fue mantenido a una temperatura cercana a los  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (colocado en un equipo Pyrex provisto con uniones esmeriladas). Se redujo la presión en el sistema (1 Torr) y los componentes volátiles se recogieron en un recipiente "ad hoc" mantenido a  $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$  (baño de aire líquido).

c) Muestreo de la fase vapor en equilibrio con el material (técnica HSA estática, Figura 1c).



**Figura 1.** Esquemas de los dispositivos utilizados en la extracción de los componentes volátiles de flores y brácteas de tilo. a) Destilación por arrastre con vapor de agua, b) destilación a presión reducida, c) *Headspace Analysis* (HSA).

El material fue colocado en un recipiente de vidrio (volumen total 200 cm) herméticamente cerrado, provisto de una tapa con diafragma de silicona ("septum") que permitía la introducción de la aguja de una jeringa para gases y mantenido a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (baño de arena) durante 1 h. Al cabo de este tiempo se procedió a extraer la muestra de vapores para su correspondiente análisis.

La técnica del muestreo de la fase vapor en equilibrio con matrices líquidas o sólidas de muy distintos tipos de materiales ("*Headspace Analysts*", HSA) permite la identificación y análisis cuantitativo de diversos componentes gaseosos presentes en las mismas mediante el muestreo del vapor en equilibrio, en un recipiente cerrado mantenido a temperatura constante <sup>16</sup>. En este caso un determinado componente volátil presente en una concentración C en un volumen total V, una vez equilibrado entre las dos fases (matríz-vapor), se distribuye a una cierta temperatura, de acuerdo con la expresión:

$$\text{Masa total del componente volátil, } (C_o V_o) = C_{\text{matriz}} \cdot V_{\text{matriz}} + C_{\text{vapor}} \cdot V_{\text{vapor}}$$

donde:

|                     |   |   |
|---------------------|---|---|
| $C_{\text{matriz}}$ | = | Concentración del componente en la matriz |
| $V_{\text{matriz}}$ | = | Volumen de la matriz                      |
| $C_{\text{vapor}}$  | = | Concentración del componente en el vapor  |
| $V_{\text{vapor}}$  | = | Volumen de vapor analizado                |

La principal ventaja de esta técnica es que evita la introducción en el cromatógrafo de cantidades inconvenientes de solventes o de componentes no deseados (agua o sustancias muy poco volátiles, respectivamente), que presentes en la matriz (sólida o líquida) tienen un efecto perjudicial para el funcionamiento de algunas columnas de fase gaseosa, especialmente las de tipo capilar afectando sus sobresalientes características de elevada resolución.

Si se aplica la ecuación anterior al análisis de componentes volátiles presentes en el material proveniente de un vegetal, resulta:

$$\text{Masa total componente } (C_o V_o) = C_{\text{vegetal}} \cdot V_{\text{vegetal}} + C_{\text{vapor}} \cdot V_{\text{vapor}}$$

Dado que el coeficiente de reparto del componente cuya concentración interesa conocer ( $K_t$ ), es igual a la relación de sus concentraciones en las dos fases (vapor y material a ser analizado, respectivamente) a una dada temperatura:

$$K_t = C_{\text{vapor}} / C_{\text{vegetal}}$$

y se puede establecer entonces la siguiente ecuación general:

$$\text{Masa total componente} = C_{\text{vapor}} \cdot (K_t^{-1} \cdot V_{\text{vegetal}} + V_{\text{vapor}})$$

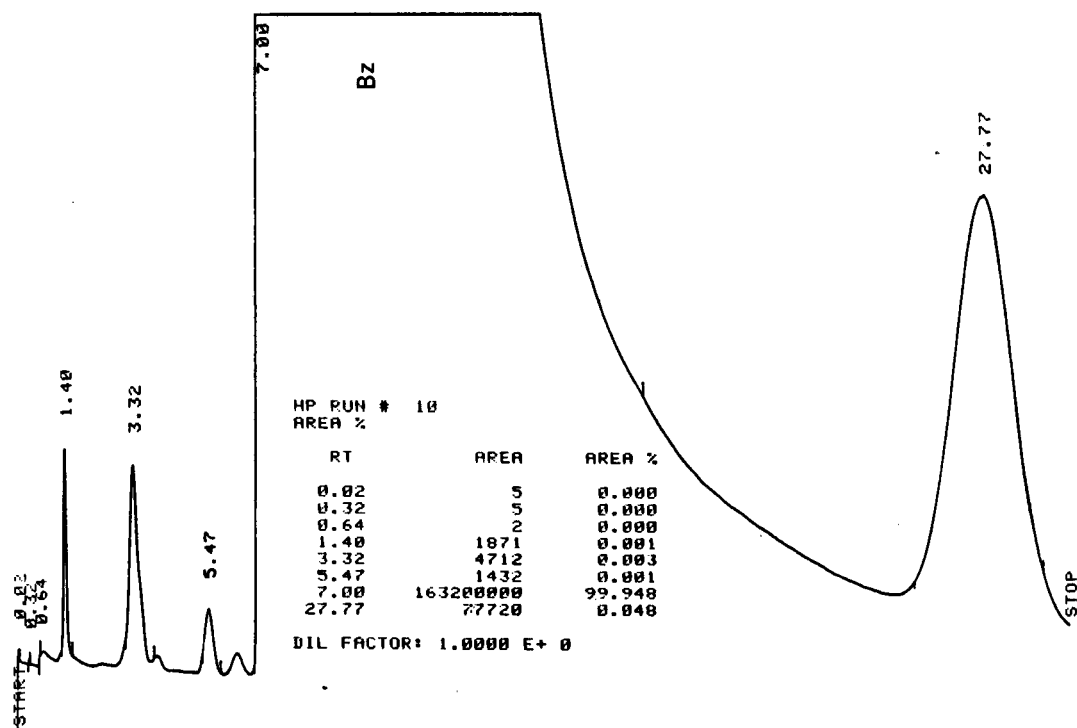
Es evidente entonces que, cuanto mayor sea el valor de  $K_t$  de un componente dado, menor será la masa del mismo que podrá ser detectada por la técnica en determinadas condiciones de muestreo y de operación de un sistema de análisis cromatográfico.

Con las soluciones acuosas de los componentes volátiles obtenidos por los métodos de destilación por arrastre con vapor de agua y a presión reducida y el vapor proveniente de aplicar la técnica HSA se realizaron los correspondientes análisis por cromatografía gaseosa (100 ml de muestra líquida y 500 ml de vapor). A tal fin se utilizó un equipo Hewlett-Packard, modelo 5840 A con una columna de acero inox. 1/8" d.e. x 6' long., rellena con "Porapak Q" (Waters Associates, Inc.), tamiz 100-120, mantenida isotérmicamente a 160 °C. El gas portador fue Nitrógeno a una presión de 40 Psi, con un caudal de 15 cm<sup>3</sup> /min. La temperatura del inyector del cromatógrafo fue de 200 °C y de 280 °C la del detector de ionización de llama de hidrógeno (FID). El tiempo total de los análisis, efectuados en las mismas condiciones de funcionamiento del cromatógrafo para los 3 métodos de extracción de los componentes volátiles empleados fue de alrededor de 30 min.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los cromatogramas típicos correspondientes a los componentes volátiles de *Tilia americana* L. moltkei (Dippel) Xifreda, obtenidos mediante los 3 procedimientos de extracción utilizados permiten señalar entre ellos las siguientes diferencias que los caracterizan:

La destilación por arrastre con vapor del material vegetal estudiado resulta ser el método que permite recuperar más efectivamente los componentes con mayores tiempos de retención, (Fig. 2) que son probablemente los menos volátiles, ya que el proceso de separación del polímero "Porapak" depende de fenómenos de adsorción-partición que no permiten predecir el orden de elución de los solutos en la columna cromatográfica utilizada. Por otra parte la reproducibilidad de los diferentes análisis de una misma muestra por este método de extracción no es precisamente la mejor si se la compara con las otras técnicas aplicadas en este trabajo.



**Figura 2.** Cromatograma de los componentes volátiles de flores y brácteas de *Tilia americana* L. moltkei (Dippel) Xifreda, extraídos por destilación por arrastre con vapor de agua.

En el método por destilación molecular evidentemente se pierden algunos componentes con menores tiempos de retención (Fig 3); posiblemente en el manipuleo del material recogido al estado sólido (-190 °C), el cual es necesario luego fundir para su introducción en el cromatógrafo.

En cambio, el método HSA da lugar a cromatogramas de mayor precisión con picos bien resueltos, que facilitan el análisis cuali-cuantitativo de los componentes presentes, en particular los de mayor volatilidad (Fig. 4)

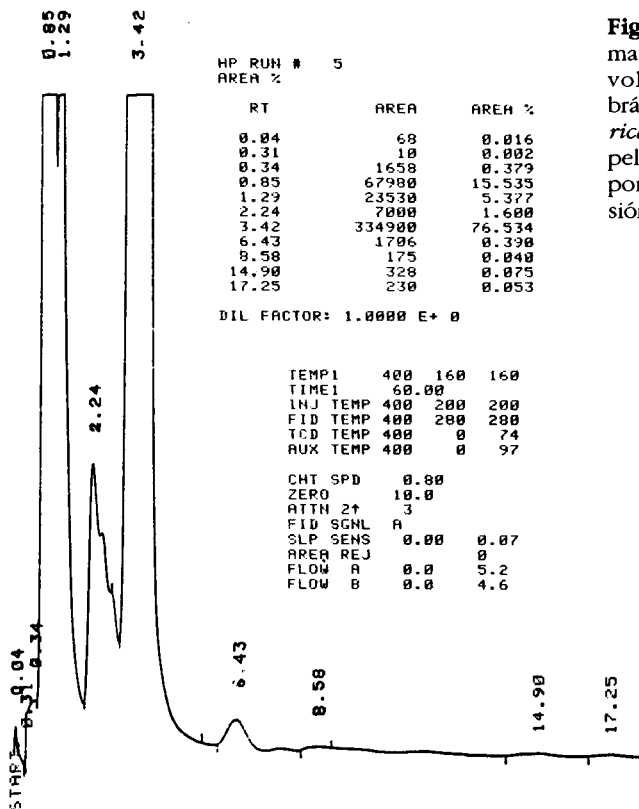


Figura 3. Cromatograma de los compuestos volátiles de flores y brácteas de *Tilia americana* L. *moltkei* (Dip-pel) Xifreda, extraídos por destilación a presión reducida.

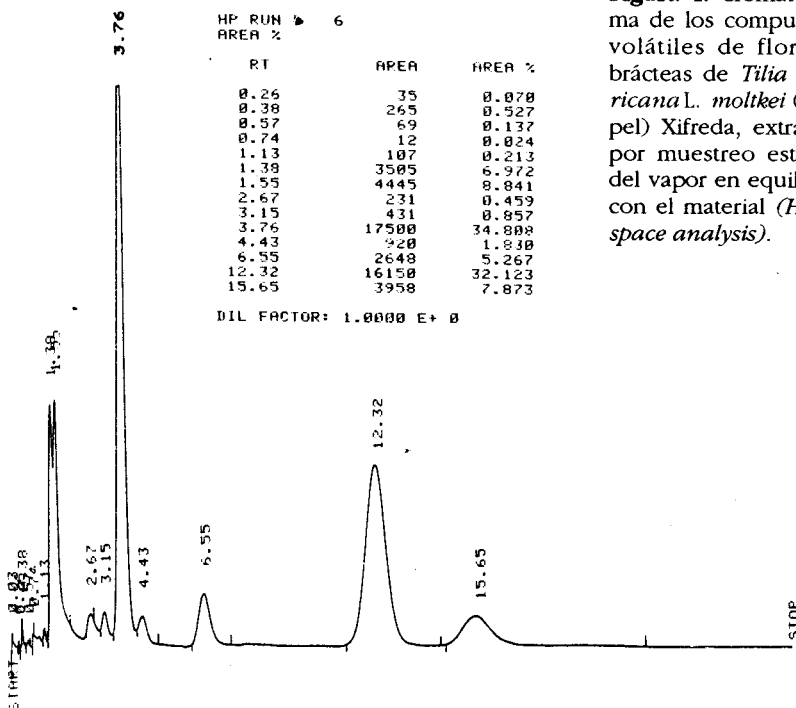
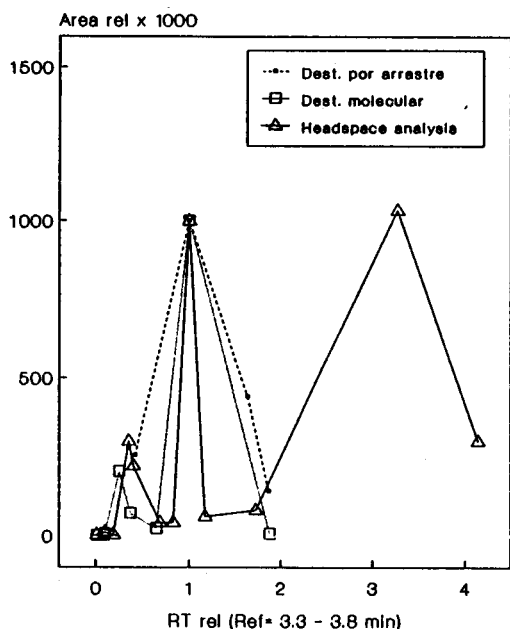


Figura 4. Cromatograma de los compuestos volátiles de flores y brácteas de *Tilia americana* L. *moltkei* (Dip-pel) Xifreda, extraídos por muestreo estático del vapor en equilibrio con el material (*Head-space analysis*).

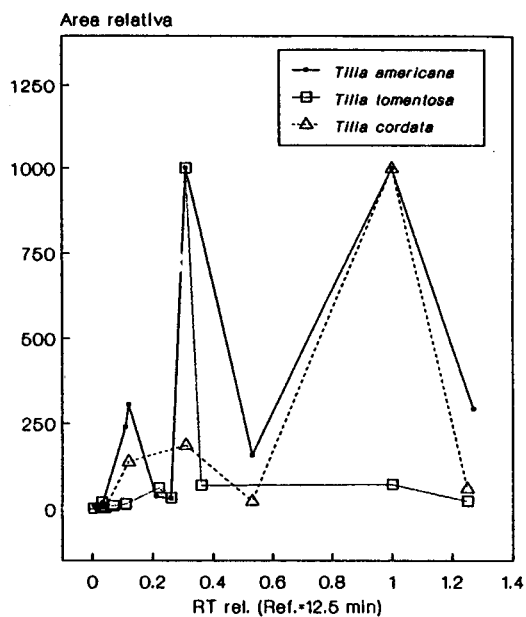
Los tiempos de retención de los componentes volátiles obtenidos a través de los distintos métodos de extracción se expresaron en forma relativa (tiempo de retención relativo,  $RT_{rel}$ ), utilizando como referencia interna un componente común presente en las distintas muestras analizadas.

Los perfiles cromatográficos típicos de los componentes volátiles obtenidos por los tres métodos de extracción ensayados se muestra en la Fig. 5.

Las características de retención y áreas relativas de los picos cromatográficos utilizando el método HSA para el análisis de los componentes volátiles de flores y brácteas (material seco) de las 3 especies muestran una excelente reproducibilidad. Estos resultados (valores medios de por lo menos 3 determinaciones independientes), caracterizan con mayor precisión el material estudiado que en el caso de emplear los métodos de destilación por arrastre o destilación molecular (Fig. 6).



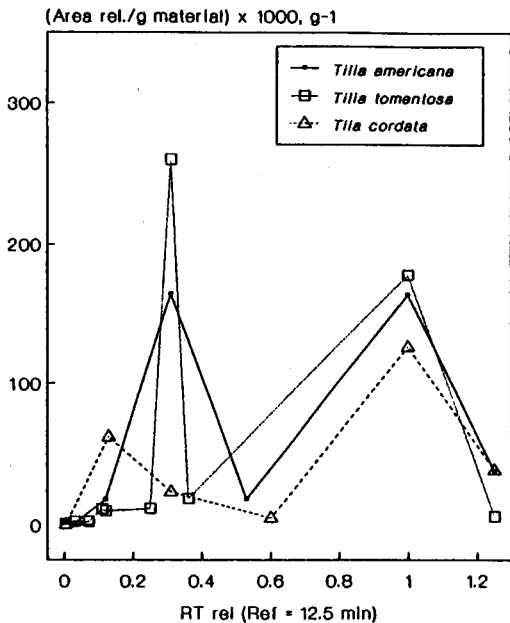
**Figura 5.** Perfiles cromatográficos típicos ( $RT_{ref} = 3,3 - 3,8$  min) de componentes volátiles de flores y sus brácteas (material secado) de *Tilia americana* L. *moltkei* (Dippel) Xifreda, obtenidos por distintos métodos de extracción.



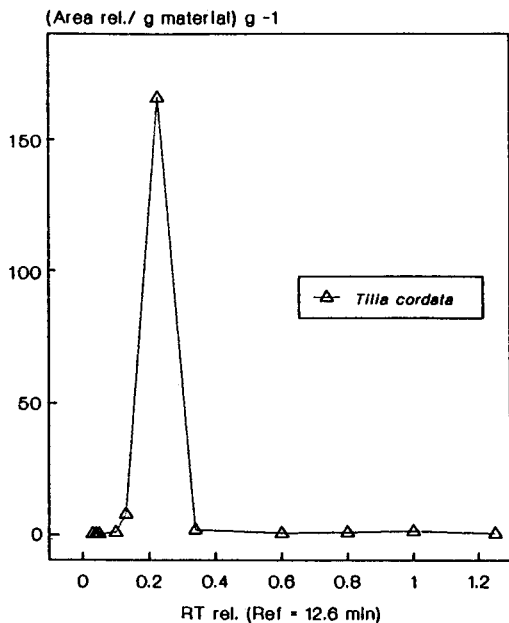
**Figura 6.** Perfiles cromatográficos típicos ( $RT_{ref} = 12,5$  min) de componentes volátiles de flores y sus brácteas (material secado) de *Tilia americana* L. *moltkei* (Dippel) Xifreda, *Tilia tomentosa* Moench y *Tilia cordata* Mill., obtenidos por el método HSA (80 °C). Valores medios de por lo menos tres determinaciones independientes.

La representación gráfica, Areas relativas/ g de material (áreas específicas) de componentes presentes en el material de las distintas especies de *Tilia* vs. tiempos de retención relativos, (Figura 7), constituye una forma simple de mostrar la composición cuali-cuantitativa de los componentes volátiles presentes en el material seco estudiado.

Además, la distribución de los componentes con mayor volatilidad ( $RT_{rel} \leq 0,32$ ) de flores y brácteas de la especie *Tilia cordata* obtenidos por HSA (Fig. 8),



**Figura 7.** Perfiles cromatográficos específicos ( $RT_{ref} = 12,5$  min) de componentes volátiles de flores y sus brácteas de *Tilia americana* L. *moltkei* (Dippel) Xifreda, *Tilia tomentosa* Moench. y *Tilia cordata* Mill., obtenidos por el método HSA (80 °C).

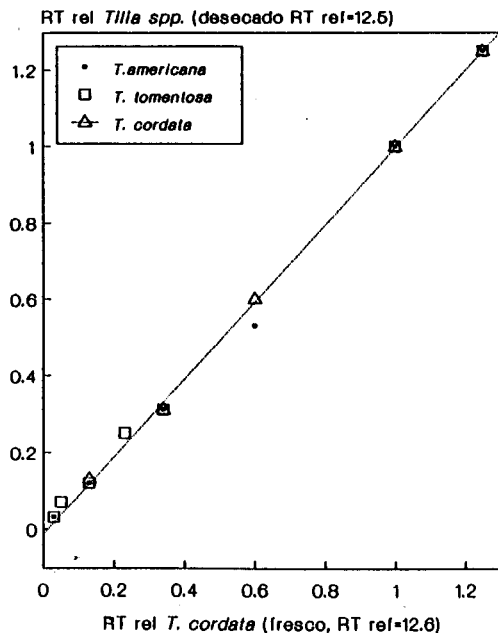


**Figura 8.** Perfil cromatográfico específico ( $RT_{ref} = 12,6$  min) de componentes volátiles de flores y sus brácteas (frescas), de *Tilia cordata* Mill., obtenidos por el método HSA (80 °C).

indica que el contenido en el material fresco es mayor (ca. 140 veces al considerar el componente común con  $RT_{rel}=0.12$ ), con respecto a la existente en el material seco analizado por la misma técnica (Fig. 7). En el material fresco se observa la presencia de un componente relativamente muy abundante (no identificado) con  $RT= 0.2$  el cual no se encuentra en el material seco.

La retención cromatográfica del material fresco de *Tilia cordata* (expresada por sus tiempos de retención relativos,  $RT_{rel}$ ) comparada con los valores correspondientes de material seco podría constituir una forma de establecer parámetros que permitirían encauzar a la determinación de la especie (Fig. 9).

En este sentido se ha adoptado como criterio de comparación el valor



**Figura 9.** Representación  $RT_{rel}$  de material desecado utilizando como referencia: *Tilia americana* L. *moltkei* (Dippel) Xifreda, *Tilia tomentosa* Moench y *Tilia cordata* Mill ( $RT_{ref} = 12,5$  min) vs  $RT_{rel}$  de componentes volátiles de flores y brácteas de *Tilia cordata* (material fresco  $RT_{ref} = 12,6$  min), según el método HSA (80 °C).



del coeficiente de correlación del tratamiento de los datos por el método de regresión lineal por cuadrados mínimos (Tabla 1).

| Especies  | r      | r <sup>2</sup> |
|---|--------|----------------|
| <i>T. americana</i> L. moltkei (Dippel) Xifreda | 0.9984 | 0.9968         |
| <i>T. tomentosa</i> Moench                      | 0.9993 | 0.9987         |
| <i>T. cordata</i> Mill.                         | 0.9996 | 0.9993         |

**Tabla 1.** Coeficientes de correlación utilizados para identificar una especie de *Tilia* (material fresco) por medio de sus RT.

No obstante haberse considerado material seco como referencia taxonómica, el análisis de los valores de los coeficientes de correlación obtenidos para el material fresco en su relación con la especie *Tilia cordata* ( $r = 0.9996$ ;  $r^2 = 0.9993$ ) concuerda con la asignación realizada por métodos botánicos convencionales. Efectivamente, en este caso los valores obtenidos son más cercanos a los que corresponderían a la recta con una correlación estrictamente ideal ( $r^2 = 1$ ).

## CONCLUSIONES

1. Los métodos de separación de componentes volátiles de flores y sus brácteas de 3 especies de *Tilia* utilizados en este trabajo: destilación por arrastre con vapor de agua, destilación a presión reducida con recolección a bajas temperaturas y HSA, permiten establecer que: a) el primero, recupera más efectivamente los componentes con mayores tiempos de retención (probablemente los menos volátiles), aunque la reproducibilidad de los diferentes análisis de una misma muestra del vegetal no es precisamente la mejor en relación con los otros métodos ensayados; en la destilación molecular se produce la pérdida de algunos componentes con los menores tiempos de retención; b) el método HSA presenta mayor precisión, con cromatogramas que muestran picos bien resueltos y de excelentes características para su evaluación cuali-cuantitativa, principalmente de los componentes más volátiles.
2. Comparando entre sí las representaciones gráficas (perfiles cromatográficos) correspondientes al método HSA, se constata que los datos pertenecientes a los componentes con tiempos de retención relativos inferiores a la unidad establecen diferencias cuali-cuantitativas significativas entre las distintas especies de *Tilia*, lo que contribuye a su diferenciación quimiotaxonómica; los demás métodos de separación de compuestos volátiles ensayados no permiten establecer esta diferenciación con el mismo grado de precisión.
3. La expresión de los resultados por medio de representaciones gráficas (áreas relativas de componentes o áreas relativas específicas vs. tiempos de retención relativos), constituye una forma clara y sencilla de establecer la composición cualitativa y cuantitativa en componentes volátiles de las diferentes especies y tipos de materiales (fresco o desecado), como también visualizar el grado de reproducibilidad de los análisis realizados.

4. Se puede proponer el empleo de diagramas (perfiles cromatográficos en fase gaseosa) de componentes volátiles de vegetales empleando principalmente la técnica HSA, como método que contribuye a la caracterización taxonómica en forma rápida y simple. Sin embargo, su aplicación efectiva a los fines de comparación requiere el almacenamiento previo del material a ser estudiado en idénticas condiciones .

**AGRADECIMIENTOS.** Los análisis cromatográficos fueron realizados en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas, (INIFTA). Los autores agradecen el apoyo económico recibido del CONICET mediante el Programa de Investigación y Desarrollo LADECOR (Laboratorio de Estudio de Compuestos Orgánicos). G.S. agradece al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires una Beca de Estudio que le fue otorgada en 1991.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Swain, T. (Eds.) (1966) "*Comparative Phytochemistry*", Londres, Academic Press. Cap.1 pág 1-18; 2 pág 21-31; 3 pág 33-55
2. Bendz, G.J. Santesson, (1974), "*Chemistry in Botanical Classification*", Academic Press, Londres
3. Smith, P.M., (1976), "*The chemotaxonomy of Plants*", Edward Arnold Londres
4. Barberio, J., J. TWibell (1991) *High Resol.Chrom.* **14**: 637-39
5. Marengo, E., C. Baiocchi, M.C. Gennaro, P.L. Bertolo (1991) *Chemometrics and Intelligent Lab. Systems* **11**: 75-88
6. Zallocchi, E., A. Pomilio, R. Palacios (1990) *Bol. Soc. Argent. Bot.* **26**: 163-72
7. Mourque, M. (1989) *Plant. Med.* **23**: 33-7
8. Hodison, V. y G. Sucin (1984) *Chujul Med.* **57**: 164-68
9. Stahl, E. (1982) *Dtsch. Apoth. Ztg.* **122**: 1951-957
10. Rousselot, R. (1971) *Plant. Med. Phytother* **5**: 159-70
11. Steinegger, E. (1964) *Sci. Pharm.* **31**: 298-302
12. HPLC: Wagner H. y G. Tittel (1983) *Dtsch. Apoth. Ztg.* **123**: 515-21
13. Lassanyi, Z.S. (1969) *Acta Agron. Budapest* **18**: 376-77
14. Bernasconi, R., J. Gebistorf (1968) *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **42**: 477-88
15. Vidal, J.P., H. Richard (1986) *Flavour and Fragrance J.* **1**: 57-62
16. Ioffe, B.V. y A.G. Vitenberg (1984) "*Headspace Analysis and Related Methods in Gas Chromatography*" Wiley Interscience, New York