

Micropropagación de plantas de *Mentha piperita* y evaluación de sus constituyentes volátiles

Mentha piperita micropropagation and volatil constituents evaluation

Jorge Ignacio Zapata*, Gloria Azucena Fernández**

RESUMEN

La aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en especies aromáticas y medicinales puede constituirse en un renglón importante para la economía de pequeños agricultores, debido a su alto potencial de comercialización y producción. Se pretende en este trabajo demostrar una vía de aplicación semi-industrial para cultivar masivamente especies vegetales de *Mentha piperita*, debido a la aceptación y consumo mundial de su aceite esencial.

Se estudiaron diferentes variedades de *Mentha* para evaluar su rendimiento de producción de aceite esencial y su calidad, antes y después de la micropropagación. Para lograr el objetivo propuesto, se ensayaron diversos medios de cultivo y sus respectivos balances de fitohormonas y vitaminas para lograr el máximo de multiplicación. Además se caracterizó el aceite esencial por medio de la técnica de análisis instrumental de cromatografía de gases.

Los resultados fueron promisorios para la micropropagación, utilizando el medio basal de Lin & Staba (1962), suplementado con BAP y algunas vitaminas. En cuanto a la eficiencia de extracción y la calidad del aceite esencial, no se encontraron diferencias significativas.

Palabras Clave: cultivo de tejidos vegetales, menta, hierbas aromáticas, cromatografía de gases, aceites esenciales.

SUMMARY

The use of *in vitro* plant tissue culture techniques for the propagation of aromatic and medicinal species, could play very promising role for the economy of small farmers, due to the high potential of industrialization of their essential oils. In this work is shown how the tissue culture technique has been used for the propagation of *Mentha piperita*, as its essential oil is widely used in the flavor and fragrance industry.

Mints from different sources were studied, and evaluation of the yield and quality of the essential oil was carry out, before and after the micropropagation by plant tissue culture.

Several basal mediums with different proportion of plant growth regulators and vitamins were tested in order to maximize the propagation results. The constituents of the essential oil were quantified by Gas Chromatography.

Lin & Staba (1962) basal medium, supplemented with BAP, and some vitamins, was the best for mints species micropropagation. The yield and quality of essential oil produced by plant tissue culture and its mother plant were very similar.

Keywords: plant tissue culture, mint, peppermint, aromatic herbs, gas chromatography, essential oils.

INTRODUCCIÓN

El avance de las técnicas biotecnológicas ha permitido aplicar nuevos procesos a la industria productiva. Una de estas técnicas, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) *in vitro*, ha expandido sus fronteras a tal punto, que la aplicación industrial se ha visto invadida por nuevas y excelentes ideas tecnológicas, en busca de nuevos productos y procesos para mejorar la calidad de vida de la humanidad.

* Jefe del Centro de Estudios y de Investigación en Biotecnología, CIBIOT, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín-Colombia. Circular 1 No. 70-01, AA 56006. e-mail: jorgez@logos.upb.edu.co

**Jefe Sección de Biología. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico, CIDT. Compañía Colombiana de Tabaco S.A.- Coltabaco. Medellín-Colombia. e-mail: azucena@epm.net.co

Hasta el momento son pocos los trabajos reportados con la aplicación del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, en especies que proporcionan sabores y fragancias. Aunque el mercado de los aceites esenciales y oleorresinas del mundo continúa creciendo en valores mayores al 33% anual, el desarrollo es precario en América Latina. Para muchos países latinoamericanos, el CTV de especies aromáticas y medicinales puede constituir una nueva industria promisoriosa, convirtiéndose en proveedores de un sinnúmero de compuestos naturales utilizados como materia prima en industrias alimenticias, farmacéuticas, de cosméticos, perfumería y muchas otras.

Aunque el valor agregado de estos productos es alto en el mercado mundial, también sus exigencias de calidad lo son, y deben complementarse con técnicas avanzadas de análisis instrumental que certifiquen una óptima calidad del producto finalmente ofrecido.

La *Mentha piperita* es una fuente natural del L- mentol, el cual posee propiedades estimulantes, asépticas y brinda

una sensación de frescura. El aceite esencial de esta planta es comúnmente denominado "Peppermint" y es uno de los de mayor aceptación y consumo en el mundo. Sus aplicaciones son diversas en productos farmacéuticos, alimentos, bebidas, productos de higiene y pastas dentífricas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron esquejes de *Mentha piperita* obtenidos del Jardín Botánico de París (Francia), de plantaciones de la región central de Colombia (tres plantas diferentes de cultivos distintos) y semillas certificadas de Japón. Todos fueron cultivados en invernadero en condiciones ambientales normales y les fueron suministrados los nutrientes necesarios para una correcta fertilización mineral, cada dos meses. Después de tres meses estas plantas fueron la fuente de explantes para los ensayos de micropropagación *in vitro*.

Tabla 1. Concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, seleccionadas en la técnica de experimentación al azar, para la micropropagación de *Mentha piperita* a partir de meristemos.

Regulador de crecimiento Concentración en mg/l Ensayo	BAP	KIN	ANA	AIB	2,4-D
1	0	1	1	0	0
2	0	1	1	1	0
3	0	1	1	3	0
4	0	1	1	5	0
5	0,5	1	1	0	0
6	0,5	1	1	1	0
7	0,5	1	1	3	0
8	0,5	1	1	5	0
9	1	1	1	0	0
10	1	1	1	1	0
11	1	1	1	3	0
12	1	1	1	5	0
13	3	1	1	0	0
14	3	1	1	1	0
15	3	1	1	3	0
16	3	1	1	5	0
17	5	1	1	0	0
18	5	1	1	1	0
19	5	1	1	3	0
20	5	1	1	5	0
21	1	5	0	0	0
22	1	7	0	0	0
23	1	7	0	0	3
24	1	7	0	0	6

Establecimiento de los cultivos asépticos

Los explantes utilizados fueron tallos, hojas, meristemos apicales y caulinares, extraídos de las plantas madres de invernadero. Los explantes fueron lavados con abundante agua destilada, luego desinfectados durante 5 minutos con etanol (70%v/v), 5 minutos con hipoclorito de sodio (5,25% v/v) con un tensioactivo (Tween 20 al 0.01%), finalizando con tres enjuagues con agua bidestilada estéril. Se usó el medio basal de Lin & Staba (1962), el cual fue suplementado con sacarosa (2%), mioinositol (100 mg/l) y agar bacteriológico (DIFCO al 7,5%). Las auxinas 2,4-D, ANA y AIB (SIGMA), las citoquininas KIN y BAP (SIGMA), se incorporaron al medio de cultivo en diferentes concentraciones según el objetivo de producción del material vegetal, tal como se indica en la tabla 1. Se utilizó una técnica de experimentación al azar. El pH se ajustó a 5.8 y autoclavado a 15 psi y 121 °C; además fueron establecidas las variables de intensidad de luz en 1.300 unidades lux, en un cuarto de incubación del material vegetal con una humedad relativa de 40% y una temperatura de 25°C y en continua presencia de luz. Cada experimento fue replicado 24 veces.

Establecimiento de las plántulas en suelo

Las plantas regeneradas *in vitro* fueron transferidas a semilleros que contenían vermiculita (30%), tierra y arena estéril, suplementado con 15 kg de nitrógeno/ha, 30 kg de fósforo/ha y 25 kg de potasio/ha. Finalmente, después de 22 días, se pasaron a condiciones similares en invernadero.

Análisis cuantitativo del aceite esencial mediante cromatografía de gases

Se seleccionaron los materiales vegetales de las plantas de invernadero, de los callos y de las plantas *in vitro* para

su posterior extracción. Luego se prepararon las muestras de tejido vegetal por el método de microdestilación de Likens y Nickerson (Sandra y Bicchi, 1987; Lam, *et al.*, 1986), utilizando solventes inmiscibles como agua (35 ml con temperatura de extracción de 95°C) y diclorometano (2 ml a una temperatura de 40±1°C, bajo un baño María), usando 5 g de material vegetal durante 75 minutos en un proceso de extracción continua. La temperatura del fluido condensador fue de 5±1°C, con un tiempo de estabilización del sistema de 20 minutos. El cromatógrafo de gases usado fue un Shimadzu GC-15A con un integrador Shimadzu C-R3A Chromatopac y un detector FID. El gas portador fue nitrógeno a 1.5 ml/min y split de 1:50, con una columna capilar de acero inoxidable de Carbowax 20M de 0.3 mm de diámetro interno y 25 m de longitud (Hewlett Packard). Las temperaturas del FID y del inyector de 250°C y en la columna de 50°C durante 5 minutos, después isoterma a 170°C. (Analytical Methods Committee, 1988; Bicchi y D'Amato, 1989; Bicchi, *et al.*, 1988; Bicchi, *et al.*, 1985; Chivala, *et al.*, 1982; Drozd y Novak, 1979; Godefroot, *et al.*, 1981; Holm, *et al.*, 1989; Kawabe, *et al.*, 1993; Sandra y Bicchi, 1987; Sur, 1991). El estándar interno usado fue 2-octanol (Wermann y Knorr, 1993).

RESULTADOS

Después de correr todas las muestras de aceite esencial de las plantas, los resultados del análisis cromatográfico se describen en la tabla 2.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El cultivo de tallos y hojas de diversas edades de la *Mentha piperita* presentó algunos problemas para el establecimiento *in vitro*, por su grado de contaminación (9% y 90% res-

Tabla 2. Composición del aceite esencial de diferentes variedades de *Mentha* obtenidas por cromatografía de gases

Muestra/ compuesto	Tr (min) (min)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)
Mentona	20.340	8,39	7,35	2,19	8,35	3,09	2,13	6,52	23,09	7,38	50,24
Isomentona	21.692	3,35	1,45	0,71	4,81	36,66	—	1,70	12,33	3,51	15,56
Lanaloool	24.572	2,34	—	0,99	4,72	—	—	14,18	2,53	4,69	—
Linalyl Acetato	24.847	—	10,80	0,50	—	—	—	—	—	—	14,33
Mentol	28.167	50,66	9,15	0,97	71,65	0,41	1,47	3,79	43,48	59,30	—
Pulegona	28.560	2,05	2,59	0,27	—	46,44	1,01	57,74	1,35	—	—
Terpineol	30.775	0,10	0,29	—	—	—	—	—	—	—	—
Carvona	32.398	0,32	—	—	1,51	—	—	—	0,89	—	—
Desconocido	41.500	—	—	41,13	0,37	—	75,51	—	—	0,57	—
Desconocido	46.400	—	—	31,40	—	—	—	—	—	—	—

Clase de muestras:

Tr. Tiempo de retención del componente respectivo, en las condiciones indicadas de Cromatografía gaseosa.

Muestra 1. *Mentha piperita* nacional, producida *in vitro*, adaptada a campo y cosechada a los tres meses.

Muestra 2. *Mentha piperita* París, de reproducción vegetativa, cosechada a los tres meses.

Muestra 3. *Mentha piperita* Japón, de reproducción vegetativa, cosechada a los tres meses.

Muestra 4. *Mentha piperita* nacional, de reproducción vegetativa, cosechada a los tres meses.

Muestra 5. *Mentha piperita* París, producida *in vitro*, cosechada a medio mes.

Muestra 6. *Mentha piperita* Japón, producida *in vitro*, cosechada a medio mes.

Muestra 7. *Mentha piperita* nacional, producida *in vitro*, cosechada a medio mes.

Muestra 8. Aceite esencial de *Mentha piperita*, suministrado por distribuidor internacional.

Muestra 9. Aceite esencial de *Mentha piperita*, suministrado por distribuidor nacional.

Muestra 10. Callos de *Mentha piperita*, extracción y análisis realizado a callos *in vitro*.

pectivamente); además, después de realizar la descontaminación del explante, en muchos casos se presentaba destrucción y daño físico en el material foliar. Los medios basales sin adición de hormonas no regeneraron ninguna actividad celular después de 10 semanas de cultivados. El medio Lin & Staba equivale a $1/2$ MS, donde se comprobó que su uso no afecta considerablemente la respuesta del explante. La adición de KIN y ANA, no proporcionan inducción alguna en los explantes, diferente al AIB, 2,4-D y KIN, que inducen la producción de callos después de 20 días de cultivados, hecho comprobado por Ravishankar y Venkataraman (1988). La adición de la KIN (1 mg/l) + BAP (1 mg/l) proporcionó la regeneración masiva de plántulas

después de 7 días de inoculación. Una vez introducido el BAP en los medios de cultivo, se logró la mejor respuesta y propagación de la *Mentha piperita*, resultado que es similar al obtenido por Repčáková y Rychlova (1986) en un medio basal de Linsmaier y Skoog. Para inducir el enraizamiento en el mismo frasco, se usó AIB (1 mg/l); en estas condiciones el sistema radicular fue bueno para su trasplante al suelo y adaptación adecuada. El uso de mioinositol en concentraciones de 100 a 5.000 ppm, no presentó ninguna diferencia con los otros medios ensayados, contrario a lo afirmado por Roca y Mroginski (1991), quienes plantean una repercusión en la presión osmótica para el inicio de actividades de regeneración de los explantes de *Mentha piperita*. No

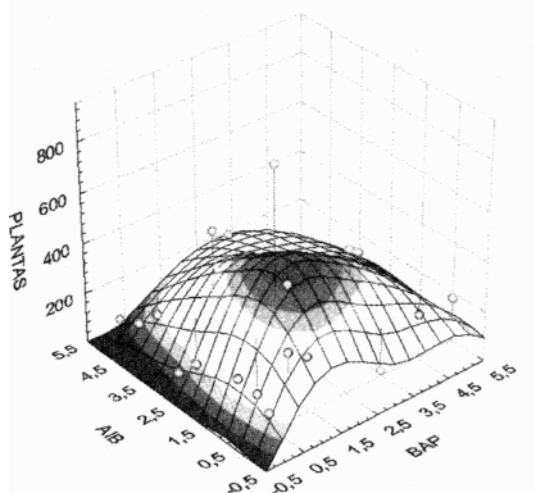


Figura 1. Resultados de la producción de plantas *in vitro* (plantas totales obtenidas en cada ensayo de 50 frascos), mediante la combinación de los reguladores de crecimiento AIB y BAP, manteniendo constantes 1 mg/l de KIN y 1 mg/l de ANA.

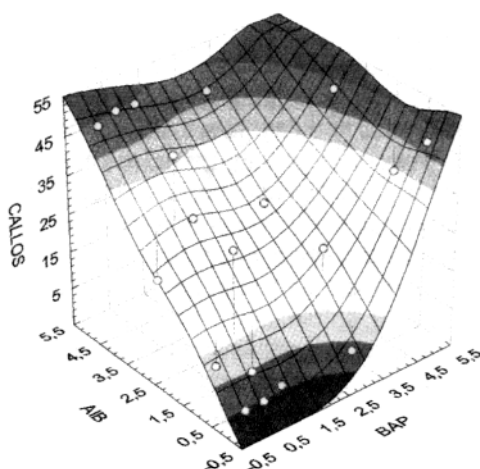


Figura 2. Resultados de la producción de callos *in vitro* (callos totales obtenidos en cada ensayo de 50 frascos), mediante la combinación de los reguladores de crecimiento AIB y BAR manteniendo constantes 1 mg/l de KIN y 1 mg/l de ANA.

hubo diferencias considerables en el CTV de las tres variedades utilizadas.

En el medio de cultivo descrito se produjeron las plántulas con un coeficiente de multiplicación de 19 nuevos brotes por cada brote sembrado por frasco (ver figura 1), regeneradas directamente, de las cuales muchas fueron subcultivadas cada 22 días en medio fresco, como fuente de nuevos explantes. Los resultados obtenidos en este trabajo estuvieron acordes con los reportados por Lin y Staba (1962); Repčáková *et al.*, (1986); Rech y Pires (1986); Ravishankar y Venkataraman (1988); Holm *et al.* (1989) y Kawabe *et al.* (1993), quienes cultivaron exitosamente hojas, tallos y yemas axilares, produciendo diferentes tejidos (callos, brotes, plantas y raíces). Resultados similares fueron encontrados en trabajos descritos por Repčáková y colaboradores (1986), quienes obtuvieron una regeneración directa de plantas y raíces a partir del tejido meristemático, consiguiendo un alto grado de uniformidad y conservación del genotipo inicial.

No fue necesaria la presencia de períodos de oscuridad durante la incubación y crecimiento de los explantes, ni períodos de excesiva oscuridad para la respuesta inicial del explante. La adaptación de las plantas al suelo no presentó ninguna exigencia; por el contrario, fue rápida y con excelente vigor.

El máximo valor de rendimiento alcanzado para la producción del aceite esencial fue de 0,741%, que no difiere consi-

derablemente con el obtenido de las plantas antes de micropropagar de 0,730%. La *Mentha piperita* colombiana después de ser cultivada *in vitro* y adaptada a campo, mostró una disminución de 71,64% a 50,66% en el contenido de L-mentol; tal hecho se explica por la alta cantidad de pulegona (2,1%) en la muestra de CTV, debido a que este compuesto es el precursor del L-mentol a través de la mentona. La mentona y la isomentona se mantienen constantes en las dos muestras, como se ilustra en la tabla 3; se comprueba que el aceite esencial no varió significativamente.

Tabla 3. Comparación de la composición del aceite esencial entre las variedades de *Mentha piperita* colombianas, antes y después de micropropagar

Reproducción de la planta	CTV	Vegetativa
Mentona	8,39%	8,35%
Isomentona	3,35%	4,80%

Con la muestra de *Mentha piperita* de Francia, se comprobaron los resultados obtenidos por Kawabe *et al.* (1992): que la pulegona es el precursor del L-mentol. Se encontró en la muestra cosechada a los 3 meses en campo pulegona (2,59%) y mentol (9,15%), a diferencia de la muestra cosechada en un mes, con pulegona (46,4%) y mentol (0,4%). En la figura 3 se ilustra la ruta biosintética del L-mentol, demostrada por Kawabe y colaboradores (1992) y por

Werrman y Knorr (1993). Esta vía metabólica determina la biosíntesis de monoterpenos en *Mentha piperita*, donde se indica como el precursor inicial a la pulegona, ya sea en plantas jóvenes o maduras. Obsérvese que los productos finales no son más que estereoisómeros que finalmente alteran las características organolépticas de los aceites esenciales obtenidos. Lo anterior permite deducir que el tiempo de cosecha es una variable crítica del proceso de producción.

En la *Mentha piperita* de Japón, se encontraron dos picos desconocidos a los 41,5 y 46,4 minutos de elución; además no se hallaron niveles adecuados de L-mentol, lo que hace poco comercial su aceite esencial.

Se analizaron muestras de *Mentha piperita* colombiana tomadas de los frascos *in vitro* a diferentes valores de fitohormonas (1 mg/l de AIB y 1 mg/l de BAP), comprobándose sólo la existencia de altos niveles de pulegona (>60%) y mentona (>4%), lo cual ratifica la vía biosintética del L-mentol.

CONCLUSIONES

- Los explantes adecuados para realizar la micropropagación masiva de la *Mentha piperita* fueron los meristemos apicales y caulinares, debido a que otros tejidos requieren períodos de excesiva descontaminación. Po-

siblemente se precisan otros métodos de limpieza en vegetales.

- El medio basal que cumple con los requerimientos nutricionales para la especie en cuestión es el de Lin & Staba (1962).
- Los requerimientos hormonales de reguladores de crecimiento para el medio de propagación masiva de *Mentha piperita* fueron: 1 mg/l de BAP, 1 mg/l de KIN y 1 mg/l de ANA, y para inducir el crecimiento del sistema radicular, fue necesario adicionar 1 mg/l de AIB, permitiendo un coeficiente de multiplicación promedio de 19 brotes.
- Para producción de callos resultó benéfica la adición de 6 mg/l de 2,4-D, o también el incremento de las concentraciones de AIB y BAP, como lo ilustra la figura 2.
- La coloración negra de los explantes y callos, se debe a que las células excretan monoterpenos que se oxidan fácilmente en presencia de la luz y del oxígeno presente en el sistema.
- La variedad japonesa probablemente requiera mayor tiempo de cosecha para alcanzar los niveles óptimos de L-mentol.
- Los contenidos de aceite esencial presentan algunas variaciones después de cultivados *in vitro*, pero el rendimiento no se vio alterado.

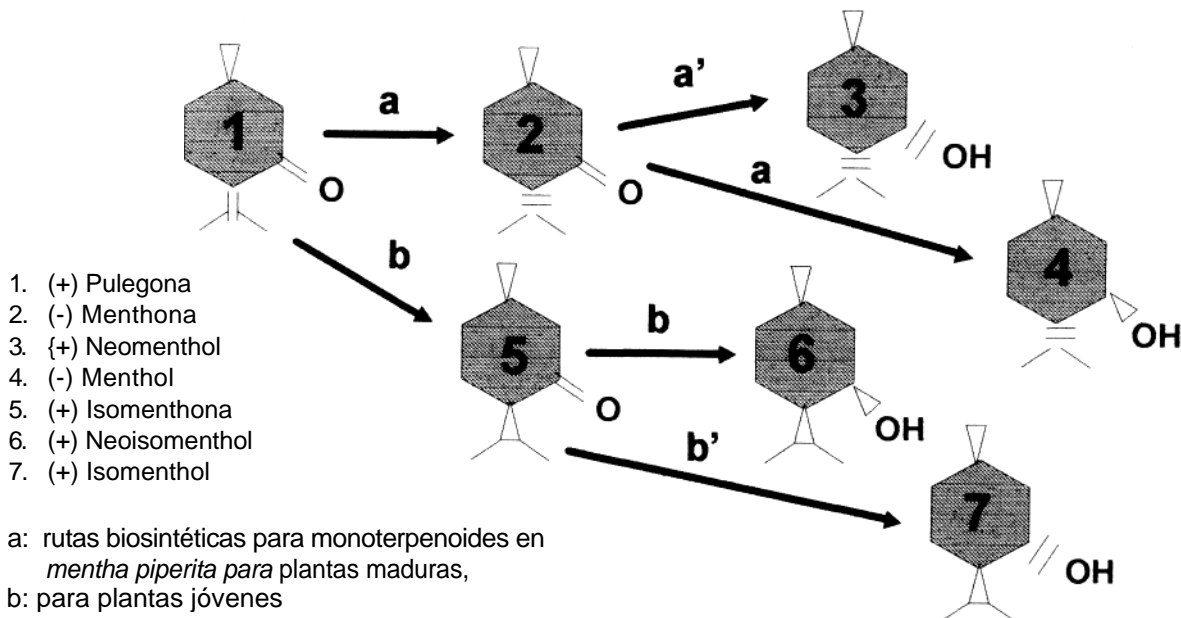


Figura 3. Biosíntesis de monoterpenos en células de *Mentha piperita*. (Kawabe; Fujiwara; Murakami y Hosomi, 1993; Werrman y Knorr, 1993).

- La variedad de Colombia presentó los mejores niveles de L- mentol en todos los ensayos.
- Se comprobó la presencia de la pulegona como precursor del L- mentol en la vía biosintética.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento al director del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDT) de la Compañía Colombiana de Tabaco S.A. Medellín, doctor Francisco José Palacio Ramírez, quien permitió que esta investigación fuese una realidad. También se agradece al doctor Dagoberto Castro, investigador de la Universidad Católica de Oriente, Rionegro; por su colaboración en la formulación de este artículo.

REFERENCIAS

- Analytical Methods Committee. 1988. Application of Gas-Liquid Chromatography to the Analysis of Essential Oils. Part XII. Determination of Octan-3-ol in Oils of Peppermint and Mint. *Analyst*. 113:657-659.
- Bicchi, C., D'Amato, A. 1989. Capturing of Volatiles Emitted by Living Plants by Means of Thick Film Open Tubular Traps. *Journal of High Resolution Chromatography*. 12:316-321.
- Bicchi, C., Frattini, C., Nano, G. M., D'Amato, A. 1988. On Column Injection-Dual Channel Analysis of Essential Oils. *Journal of High Resolution Chromatography* 11:56-60.
- Bicchi, C., D'Amato, A., Frattini, C., Nano, G. M., Capelletti, E., Caniato, R. 1985. Analysis of Essential Oils by Direct Sampling from Plant Secretory Structures and Capillary Gas Chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. 8:431-435.
- Chivala, F., Gabri, G., Liddle, A. P., Ulian, F. 1982. Qualitative Evaluation of Aromatic Herbs by Direct Headspace GC Analysis. Applications of the Method and Comparison with the Traditional Analysis of Essential Oils. *Journal of High Resolution Chromatography and CC*. 5:182-188.
- Drozd, J.; Novak, J. 1979. Headspace Gas Chromatography. *Journal of Chromatography*. 165:141 -165.
- Godefroot, G., Sandra, P., Verzele, M. 1981. New Method for Quantitative Essential Oil Analysis. *Journal of Chromatography*. 203:325-335.
- Holm, Y., Hiltunen, R., Jokien, K., Tormala, T. 1989. On the Quality of the Volatile Oil in Micropropagated Peppermint. *Flavour and Fragrance Journal*. 4:81-84.
- Kawabe, S., Fujiwara, H., Murakami, K., Hosomi, K. 1993. Volatile Constituents of *Mentha arvensis* Cultures. *Biosci. Biotech. Biochem*. 57:657-658.
- Lam, K., Nickerson, G. B., Deinzer, M. L. 1986. A Rapid Solvent Extraction Method for Hop Essential Oils. *Journal of Agric. Food Chem*. 34:63-66.
- Lin-Mei, L., Staba, E. J. 1962. Peppermint and Spearmint Tissue Cultures. Callus Formation and Submerged Culture. *Lloydia*. 24(3) 139-145.
- Ravishankar, G. A., Venkataraman, L. V. 1988. Rapid Multiplication of Plants from Cultured Axillary Buds of *Mentha piperita*. *Philippine Journal of Science*. 117. Parte 2.121-129.
- Repčáková, K., Rychlova, M., Chellárová, E., Honcariv, R. 1986. Micropropagation of *Mentha piperita* L Through Tissue Cultures. *Herba Hungarica*. 25. (2) 77-88.
- Roca, W., Mroginski, L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali, Colombia.
- Sandra, P., Bicchi, C. 1987. Chromatographic Methods: Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. New York, Huething, p. 435.
- Srivastava, N. K., Luthra, R. 1993. The Relation Between Primary and Secondary Metabolism in Peppermint Under Fe-Stress. *Journal of Essential Oil Research*. 5:525-534.
- Sur, S. V., Tuljapa, F. M., Sur, L. I. 1991. Gas Chromatography Determination of Monoterpenes in Essential Oil Medicinal Plants. *Journal of Chromatography*. 542:451 -458.
- Werrman, U., Knorr, D. 1993. Conversión of Menthyl Acétate or Neomenthyl Acétate into Menthol or Neomenthol by Cell Suspensión Cultures of *Mentha canadiensis* and *Mentha piperita*. *Journal of Agric. Food Chem*. 41:517-520.