

## Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander

Granados Conde Clemente<sup>1</sup>., Yáñez Rueda Xiomara<sup>2</sup>., Santafé Patiño Gilmar Gabriel<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento Ingeniería y de Alimentos. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV. Universidad de Pamplona. Pamplona .Norte de Santander. Colombia.

<sup>2</sup>Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV), Universidad de Pamplona, Extensión Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.

<sup>3</sup>Grupo de Investigación en Productos Naturales. Departamento de Química. Universidad de Córdoba. Montería. Colombia.

### Resumen

Los antioxidantes artificiales son ampliamente utilizados en la industria de alimentos, sin embargo actualmente se investiga sobre los antioxidantes naturales, siendo esto último una tendencia mundial en la preferencia del consumidor. Los aceites esenciales foliares (AE) de las especies *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis*, recolectadas en el departamento Norte de Santander (Colombia), fueron estudiados con el fin de caracterizar su composición química y determinar su actividad antioxidante. La extracción del AE se realizó por destilación por arrastre con vapor de agua y la identificación de los componentes mayoritarios se hizo por Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR). Para determinar la actividad antioxidante de los AE se utilizaron 2 métodos: Capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS<sup>+</sup> y del radical DPPH.

Los componentes mayoritarios encontrados para *C. moritzianus* fueron  $\alpha$ -Pineno, Limoneno, Eucaliptol,  $\alpha$ -Terpineol, *trans*- $\beta$ -Cariofileno y Guaiol, mientras que para *M. mollis* (variedad de orégano) fueron Acetato de  $\alpha$ -Eudesmol, Acetato de (-)-Isolongifolol, Germacreno-D, Eucaliptol y Pulegona.

El AE *Minthostachys mollis* (orégano) presentó la mayor actividad antioxidante frente al método del catión-radical ABTS<sup>+</sup> con un valor de IC<sub>50</sub> (22.7 ppm) y el mayor valor de TEAC (estándar de referencia) equivalente a 631.72  $\mu$ moles de Trolox por cada gramo de aceite, actividad que podría estar asociada a los componentes mayoritarios del AE.

**Palabras Clave:** Actividad antioxidante, aceite esencial, *Calycolpus moritzianus*, *Minthostachys mollis*, DPPH, ABTS.

### Evaluation of antioxidant activity of the essential oil of *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* of the North of Santander (Colombia)

#### Abstract

Synthetic antioxidants are widely used in food industry, however the interest has led in natural antioxidants as these are considered safer and the trend toward consumer preference for the natural products. The essential oil (EO) of leaves of *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* collected in North of Santander (Colombia), were obtained by steam distillation and were studied to characterize the chemical composition by High Resolution Gas Chromatography (HRGC) and determine its antioxidant activity.

The major components of the EO of *C. moritzianus* were  $\alpha$ -Pinene, Limonene, 1,8-Cineole, *trans*- $\beta$ -Caryophyllene y Guaiol, and for *M. mollis* (orégano) were  $\alpha$ -Eudesmol Acetate, Isolongifolol Acetate, Germacrene-D, 1,8-Cineole y Pulegone.

The oil of *Minthostachys mollis* (orégano) presented the mayor ability to entrapment of the cation-radical ABTS<sup>+</sup> with a value IC<sub>50</sub> de 22.7 ppm and the highest value of TEAC (standard) of 631.72  $\mu$ moles of Trolox per each gram of oil, activity that could be associated to the majority compounds of the oil.



13

**Key words:** Antioxidant Activity, Essential Oil, *Calycolpus moritzianus*, *Minthostachys mollis*, ABTS, DPPH.

## **Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas e *mollis* *Minthostachys moritzianus* Calycolpus Norte de Santander**

### **Resumo**

Antioxidantes artificial são amplamente utilizados na indústria alimentar, no entanto actualmente investiga antioxidantes naturais, sendo este último uma tendência mundial na preferência do consumidor. Folha óleos essenciais (AE) de espécies e *Calycolpus Minthostachys moritzianus mollis* coletadas no departamento de Norte de Santander (Colômbia), foram estudados a fim de caracterizar a sua composição química e determinar sua atividade antioxidante. AE extração pode ser realizada por destilação a vapor de água e a identificação dos componentes principais por cromatografia gasosa foi de alta resolução (HRGC). Para determinar a atividade antioxidante do AE utilizando dois métodos: ABTS encarceramento capacidade radicais cátions + e DPPH radical. Os componentes principais encontrados para *C. moritzianus* foram  $\alpha$ -pineno, limoneno, eucaliptol,  $\alpha$ -terpineol, trans- $\beta$ -cariofileno e guaiol, ao passo que *M. mollis* (variedade orégão) foram  $\alpha$ -eudesmol, acetato de etilo (-)-Isobongifolol, germacreno D, eucaliptol e pulegona. O AE *Minthostachys mollis* (orégão) teve a actividade antioxidante mais elevada em comparação com o método dos catiões radicais ABTS +, com um valor de IC50 (22,7 ppm) e o maior valor de TEAC (padrão de referência), equivalente a 631,72  $\mu$ mol Trolox por grama de óleo, uma actividade que pode ser associado com os componentes principais do AE.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante, óleo essencial, *Calycolpus moritzianus*,

\*Para citar este artículo:Granados Conde C., Yáñez Rueda X., Santafé Patiño GG.Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua:revista de la Facultad de Ciencias Básicas.2012.10 (1):12-23

+Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas:Xiomara Yáñez Rueda.Grupo de Investigación en Productos Verdes (GPV), Universidad de Pamplona.Norte de Santander.Colombia.email:xiomara.yanez@gmail.com

Recibido: Febrero 10 de 2011 Aceptado: Julio 22 de 2011

## Introducció

Colombia es un país con diversidad de ecosistemas y microclimas, que promueven una vegetación muy variada, con la presencia de especies endémicas, entre las cuales se tienen algunas que poseen aceites esenciales (AE) con principios activos, que resultan interesantes para la investigación y desarrollo de productos naturales (1). Actualmente la tendencia de los consumidores se inclina a alimentos libres de productos sintéticos (pesticidas, insecticidas, fungicidas, fertilizantes, entre otros) y aditivos químicos (neutralizantes, preservantes, antioxidantes, colorantes, saborizantes), por lo que resulta interesante estudiar la actividad antioxidante de los aceites de plantas nativas, para recomendar su potencial uso como aditivos naturales (2). Los antioxidantes se definen según el Código Alimentario como las sustancias que por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir, retrasar o inhibir en los alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y los procesos que inducen el enranciamiento natural originado por la presencia de luz, aire y metales. Como ejemplos de antioxidantes naturales tenemos el ácido ascórbico o vitamina C, que actúa en el citoplasma; el  $\beta$ -caroteno o vitamina A y el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E, que actúan en la membrana celular. Estos antioxidantes se encuentran en las frutas, verduras, plantas y otras sustancias alimenticias (3). Se ha demostrado que el orégano y otros extractos de plantas, contienen sustancias antioxidantes, lo cual permitiría utilizarlos como aditivos en los alimentos. La evaluación de la actividad antioxidante de aceites extraídos del cilantro, orégano y romero, en emulsiones de Agua/Aceite (margarina) y de Aceite/Agua, en un sistema de

reacción donde el deterioro oxidativo se aceleró por medio de la radiación UVA-VIS, reportó diferentes efectos antioxidantes. El aceite de orégano presentó la mayor protección, seguido por los de cilantro y romero (4). Otros autores han determinado la capacidad antioxidante de muchas especies, entre ellas: el orégano y la infusión de té, debido a la presencia de polifenoles, ácido rosmárico y flavonoides (5). Dada la complejidad química de los AE, el ensayo de actividad antioxidante puede arrojar resultados dispersos dependiendo del test empleado. Por lo tanto, es aconsejable un enfoque con múltiples ensayos. Entre la lista de métodos que pueden usarse para la evaluación de la actividad antioxidante muy pocos de ellos (TEAC, DPPH, PCL) son útiles para determinar la actividad de ambas especies (hidrofílica y lipofílica) y asegurar de este modo, una mejor comparación de los resultados (6,7).

En la presente investigación se utilizaron dos métodos para determinar la capacidad antioxidante: El ensayo TEAC (por sus siglas en inglés: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) o ensayo del ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) ( $ABTS^{+}$ ), el cual está basado en la captación de los antioxidantes por el radical catión  $ABTS^{+}$  generado en el medio de reacción, usando como patrón el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromán-2-carboxílico (Trolox), un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E. Este radical catión  $ABTS^{+}$  posee una coloración verde-azulada con un máximo de absorción a 415 nm y una serie de máximos secundarios de absorción a 645, 660, 734, 815 y 820 nm (8).

El segundo método se basa en la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) por los compuestos



15

antioxidantes de la muestra del AE. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza por lo general, empleando soluciones patrón de Trolox. En particular, las moléculas pequeñas con mejor accesibilidad al centro activo del radical poseen aparentemente una mayor actividad antioxidante por este método (9). El ensayo DPPH es un método rápido y sencillo que no requiere un equipamiento sofisticado, sólo un espectrofotómetro. Es un método adecuado para medir la actividad antioxidante en alimentos y extractos vegetales, mientras que no se considera adecuado para la determinación de la capacidad antioxidante del plasma o suero, ya que las proteínas precipitan con el metanol del medio de reacción (8).

El presente estudio evaluó la capacidad antioxidante del AE foliar de las especies recolectadas en nuestra región: *Calycopus moritzianus*, conocida como arrayán o cíparo y *Minthostachys mollis*, conocida como orégano, cuyos resultados podrían utilizarse como una alternativa interesante en futuros estudios que busquen reemplazar los antioxidantes artificiales en los alimentos.

## Materiales y Métodos

### Selección de la Materia Prima Vegetal

Con base en los registros de colecciones del Herbario Regional Catatumbo-Sarare (HECASE) de la Universidad de Pamplona, las facilidades de desplazamiento y las condiciones ambientales se escogieron cinco (5)

veredas en los municipios de Pamplonita, Chinácota, Toledo, Ocaña y Salazar, para la recolección de *C. moritzianus*. Con la cartografía de cada municipio y monitoreos preliminares de las especies, se determinaron en las veredas seleccionadas, las poblaciones con la mayor abundancia de individuos, en rangos altitudinales que oscilaron entre 1420 m en la vereda Las Cobradas, sector del Agua de la Virgen, municipio de Ocaña y en laderas al noroccidente cerca al casco urbano de Salazar de las Palmas; 1600 m en la vereda Pantanos, municipio de Chinácota; 1630 m en la vereda El Cucano en el municipio de Pamplonita y 1670 m en la vereda Buenavista, municipio de Toledo. Se establecieron parcelas para estimar el comportamiento de cada población. En cada parcela de 10 por 10 m se hizo un monitoreo de cada especie y se recolectaron aproximadamente 5 Kg de hojas bajo la supervisión del Magíster en Sistemática Vegetal, Luis Roberto Sánchez Montaña quien realizó la identificación taxonómica de las especies. Las muestras de orégano fueron recolectadas en el municipio de Pamplona, en la vereda de Los Animes en la carretera que conduce de Pamplona a Bucaramanga, kilómetro 5, región oriental montañosa, área despoblada y de difícil acceso, siendo una especie endémica que crece en los humedales, en región boscosa y bajo sombra; la muestras pertenecen al material foliar de plantas adultas, con hojas enteras y verdes. Las hojas fueron recolectadas en la última semana de Junio de 2009 en horas de la tarde, en época de invierno. Para evitar el deterioro del material



16

vegetal, las hojas se guardaron en el laboratorio, en cajas de cartón, en sitio aireado y fresco, a temperatura ambiente (25 °C), durante 15 días.

#### **Obtención y análisis del AE**

La obtención del AE se realizó por el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Se empleó manta de calentamiento para un balón de 4 litros. Se tomaron 400 g de material vegetal y se adicionaron 1000 ml de agua. El tiempo de extracción fue de 2 ½ h. El AE se colectó en un recipiente tipo Dean Steark. El AE se separó por decantación, fue medido en jeringa de 2 ml y almacenado en 1 vial de 4 ml de vidrio color ámbar.

El rendimiento de cada AE obtenido, se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = [(ml \text{ AE}) / (W \text{ mv})] \times 100$$

Donde, ml AE es el volumen (ml) obtenido del aceite y donde W mv corresponde al peso en gramos (g) del material vegetal.

Posteriormente a cada muestra de AE se le midieron las siguientes propiedades físicas: La densidad relativa a 20°C (en picnómetro de 2 ml), la rotación óptica (en Polarímetro), el índice de refracción (en Refractómetro ABBE) y la solubilidad en etanol (70% V/V). Para este último caso, se emplearon cuatro soluciones etanólicas de 20, 40, 60 y 80% v/v. Tomando 100 µL de cada solución, se agregaron lentamente pequeños volúmenes (2 µL) del AE, hasta que la solución se tornó turbia (punto de saturación). Cada determinación se hizo por duplicado.

El análisis de los componentes mayoritarios de cada AE se realizó por la técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR). Muestra: Se tomaron 30 µL de cada AE y se disolvieron en 1mL de diclorometano. El equipo utilizado fue un CGAR HP6890 Series, en interfase con un detector selectivo de masas HP5973 Network conectado en línea con un sistema HP-MS ChemStation y la base de datos NIST-2005. Se inyectó 1.0 µL, modo split (10:1). Temperatura inyector 250 °C. Columna capilar HP-5MS (30m x 0.25mm diámetro interno x 0.25 µm de espesor). Helio (Aga-Fano) como gas de arrastre, presión del gas 150 pKa, flujo constante de 1 ml/min y velocidad lineal de 36 cm/seg. Temperatura inicial 50°C. Temperatura de la cámara de ionización y línea de transferencia de 180 y 280°C, respectivamente. Energía de la fuente de electrones 70 eV. Los espectros de masas (EM) se obtuvieron por Ionización Electrónica, barrido automático en el rango de masas m/z 50-550 u.m.a., a 2.4 scan/s. Cada EM fue comparado con los estándares de la base de datos y los datos reportados en la literatura. Para obtener los índices de Kovats (IK) relativos a los patrones de alcanos C8-C32, el análisis se realizó en un CGAR HP 6890A Series II con detector FID a 250 °C. Flujos de aire y de hidrógeno para el detector FID de 300 y 30 mL/min. Flujo de Nitrógeno, gas auxiliar de 30 ml/min. Los datos se procesaron con un HP ChemStation 3365-II, columna capilar no polar HP-5, usando las mismas condiciones del CGAR-EM. Para la identificación y cuantificación de los componentes de cada AE se utilizó el



17

criterio cromatográfico (IK experimentales y teóricos) y el criterio espectral (EM). La composición porcentual por CG-FID de cada componente se analizó por el método de normalización de áreas (10,11).

#### **Evaluación de la actividad antioxidante de cada AE:**

Se evaluó por dos métodos: el del DPPH y el del ABTS<sup>+</sup>. De forma exploratoria, se realizaron ensayos preliminares a una concentración de 100 ppm para cada muestra de AE y de acuerdo con los resultados obtenidos, se evaluó la capacidad antioxidante a diferentes concentraciones, entre 1 y 100 ppm.

#### **Método del radical DPPH:**

Se usó la metodología(9). Para preparar el reactivo (Ver Figura 1) se tomaron 150 mg de DPPH (Sigma) y se disolvieron en 7 mL de MeOH (Merck) y la solución se llevó a oscuridad por 24 h. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas y se diluyeron con MeOH hasta una absorbancia ajustada de  $0.300 \pm 0.05$  medidos a  $\lambda = 517$  nm en el espectrofotómetro, ajustado con MeOH como blanco del equipo.

**Tubo de reacción:** Se prepararon soluciones concentradas de las muestras de 10000 ppm, 50 mg en 5ml de DMSO (Merck), y a partir de ésta se prepararon soluciones diluidas a diferentes concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm. De cada una, se tomaron 40  $\mu$ L adicionando 1960  $\mu$ L de la solución del radical DPPH<sup>\*</sup>. Ensayo por triplicado.

**Blanco de muestra:** De las celdas con las soluciones diluidas, se tomaron 40  $\mu$ L y en un tubo de ensayo se le adicionaron 1960  $\mu$ L de MeOH.

**Referencia:** A 40  $\mu$ L de DMSO se le adicionaron 1960  $\mu$ L de la solución del radical DPPH<sup>\*</sup>. Los tubos de ensayo fueron llevados a oscuridad por 30 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm empleando un espectrofotómetro Genesis 20 Thermo Spectronic modelo 4001/4, se anotaron los datos y se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh) usando la ecuación (1).

$$\%Inh = \left[ 1 - \frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{referencia}} \right] \times 100 \quad (1)$$

#### **Método del catión radical ABTS<sup>+</sup>:**

Desarrollado por (12) según modificaciones de (9), en el cual las muestras con capacidad antioxidante se añaden una vez que el ABTS<sup>+</sup> se ha formado (Ver FIGURA 2) y se determina, entonces la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical, es decir la decoloración de éste (8)

**Preparación de la solución madre de ABTS<sup>+</sup>:** Inicialmente se tomaron 17.5 mg de ABTS (Sigma) y se disolvieron en 9.9 ml de H<sub>2</sub>O estéril y 34 mg de persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) (Merck) que se disolvieron en 1 mL de H<sub>2</sub>O. Para la preparación de la solución madre se mezclaron 9.9 mL de la solución de ABTS (3.5 mM) y 0.1 mL de solución de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (1.25 mM), la solución obtenida fue almacenada en la oscuridad por 24 h. Pasado este tiempo, se tomaron alícuotas que fueron diluidas con un buffer fosfato de pH 7.4 hasta obtener una absorbancia ajustada de  $0.700 \pm 0.05$  a una  $\lambda = 734$  nm en el espectrofotómetro, el cual es encendido previamente durante 30 min. y



18

ajustado con buffer fosfato pH 7.4 como blanco del equipo.

**Preparación del buffer fosfato pH 7.4:**

Se tomaron 0.270 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 0.426 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Baxter) y se aforó hasta 500 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril.

**Evaluación de la muestra:**

**Tubo de reacción:** Se prepararon soluciones concentradas de las muestras de cada AE de 10000 ppm (50 mg en 5 ml de DMSO) y a partir de cada solución concentrada, se prepararon soluciones diluidas a diferentes concentraciones entre 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm. De cada una de las soluciones preparadas se tomaron 40  $\mu\text{L}$  y se llevaron a tubos de ensayo donde se diluyeron agregando 1960  $\mu\text{L}$  de la solución del radical catiónico  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

**Blanco de muestra:** De las celdas de las soluciones diluidas, se tomaron 40  $\mu\text{L}$  y se llevaron a tubos de ensayo donde se les adicionaron 1960  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato pH 7.4.

**Referencia:** A 40  $\mu\text{L}$  de DMSO se les adicionaron 1960  $\mu\text{L}$  de la solución del radical catiónico  $\text{ABTS}^{+\cdot}$ . Los tubos de ensayo fueron llevados a oscuridad por 30 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 734 nm, se anotaron los datos y se calculó el porcentaje de inhibición usando la ecuación (1).

Con los valores obtenidos de % Inh, se halló el valor de la concentración media inhibitoria ( $\text{IC}_{50}$ ) de la muestra. El  $\text{IC}_{50}$  de cada AE se determinó realizando una gráfica de concentración (ppm) vs. porcentaje de inhibición (% Inh), obteniendo así, una ecuación para la recta y calculando luego la concentración

para la cual el porcentaje de inhibición es del 50%. Para ambos métodos ( $\text{ABTS}^{+\cdot}$  y DPPH) se usó como estándar Trolox, cuya capacidad antioxidante se evaluó a las mismas condiciones de trabajo de las muestras. Luego, los resultados de  $\text{IC}_{50}$  de los AE son expresados como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC:  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de AE).

**Análisis estadístico:**

Se usó el programa OriginPro versión 8E para graficar los datos y realizar las regresiones lineales para obtener así los valores de  $\text{IC}_{50}$ . Los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ) con la herramienta Megastat de Microsoft Excel y Statgraphics Plus versión 5.1.

**Discusión de Resultados**

Los AE de las especies vegetales presentaron propiedades físicas comunes, tales como ser líquidos a temperatura ambiente, arrastrables por vapor de agua e insolubles en agua, con olor intenso y característico, y color amarillo pálido. En la Tabla 1 se muestra el rendimiento obtenido en la extracción del AE y las propiedades físicas medidas. El rendimiento de AE estuvo entre 1.2 y 0.6%, encontrándose un valor bastante bajo para *M. mollis*, si se tiene en cuenta que el resultado esperado a nivel general está entre el 1 y el 3%. Según(13), en estudios realizados con *M. mollis* (Muña) se pudo observar que su rendimiento fue muy bajo, de sólo 0.19 %. Las densidades a 0.92 g/ml y los índices de refracción de 1,47 son característicos de los AE de diversas especies(14) .



El AE de *C. moritzianus* para cada uno de los cinco (5) municipios presentó el mismo quimiotipo, es decir los mismos compuestos químicos, los cuales sólo varían ligeramente en las concentraciones relativas. Se destacan los monoterpenos  $\alpha$ -Pinoeno, Eucaliptol y  $\alpha$ -Terpineol, los cuales son ligeramente más abundantes en el AE proveniente de muestras del municipio de Pamplonita. De igual manera, el contenido del monoterpeno oxigenado 1,8-Cineol o Eucaliptol también fue más elevado en el AE de muestras de los municipios de Chinácota y Ocaña, mientras que, los sesquiterpenos *trans*- $\beta$ -Cariofileno y Guaiol resultaron con mayor concentración en el AE extraído de muestras recolectadas en el municipio de Salazar(15). De acuerdo con el perfil cromatográfico del AE del orégano (Figura 3) se identificaron y cuantificaron 11 componentes mayoritarios (Tabla 2), entre los que se encuentran los monoterpenos Eucaliptol y Pulegona y se destacan por su mayor concentración los sesquiterpenos Germacreno-D (11.85%), Acetato de Eudesmol (21.32%) y Acetato de Isolongifolol (20.94%), los cuales podrían estar asociados con la actividad antioxidante.

Al evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de AE a diferentes concentraciones frente al radical DPPH se obtuvieron los datos de absorbancia que fueron reemplazados en la ecuación (1) que se describe en la metodología, encontrando así los valores de porcentajes de inhibición (%Inh), que se observan en la Tabla 3. Al realizar los ensayos con las muestras de AE de cada especie vegetal, se observó que a 100,

150, 200, 250 y 300 ppm, el %Inh con el método del radical DPPH, en ningún caso se alcanzaron valores superiores al 15%, razón por la cual se descartó continuar la evaluación de la actividad antioxidante con este método, porque los valores esperados deberían ser superiores al 30%. Se podría decir que en las muestras evaluadas no se encuentran presentes compuestos que establezcan al DPPH, lo cual puede explicar la baja actividad mostrada frente a este radical. Al evaluar la capacidad antioxidante de las muestras de AE a diferentes concentraciones frente al radical catiónico ABTS<sup>+</sup> se obtuvieron los datos de absorbancia que fueron reemplazados en la ecuación (1) descrita en la metodología, para encontrar los valores de porcentajes de inhibición (% Inh), que se observan en la Tabla 4.

A 100 ppm se observa que el porcentaje de inhibición (% Inh) en *M. mollis* fue el más alto (77.83 %), lo cual sugiere que se encuentran presentes compuestos donadores de hidrógeno o de electrones que puedan estabilizar al radical catiónico ABTS<sup>+</sup>, mientras que a la misma concentración de 100 ppm para *C. moritzianus* el valor estuvo por debajo del 20%, razón por la cual se descartó continuar trabajando la actividad antioxidante con este AE. Sin embargo, se destaca que este AE presenta actividad a concentraciones mayores de 200 ppm. También es necesario resaltar, que a medida que se aumenta la concentración entre 200 y 300 ppm con *M. mollis* se alcanzaron valores superiores al 80% de inhibición, valores que tienden a estabilizarse a medida que aumenta la concentración. Teniendo en



20

cuenta que con el método ABTS<sup>+</sup>, utilizando una concentración de 100 ppm del AE de *M. mollis* se obtuvieron porcentajes de inhibición superiores al 40%, se procedió a realizar ensayos con concentraciones menores entre 1 y 50 ppm respectivamente con el fin de determinar la concentración mínima a la cual el AE mantiene su capacidad antioxidante. En la Tabla 5 se aprecia que utilizando una concentración de 50 ppm del AE de *M. mollis* el % Inh se mantiene por encima del 40% esperado. De acuerdo con la Figura 4, se grafican el % de inhibición en función de la concentración del estándar para calcular el IC<sub>50</sub> del estándar Trolox, es decir, la concentración a la cual el porcentaje de inhibición es del 50% (Y=50). De igual manera, se hace con el AE de *M. mollis*. En la Tabla 6 se muestran los datos del análisis de la regresión lineal (gráfica de % Inh en función de la concentración AE de *M. mollis*), el valor de IC<sub>50</sub> y la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC). De esta manera el valor IC<sub>50</sub> calculado para el AE de *M. mollis* es 22.7 ppm.

Con los valores de IC<sub>50</sub> encontramos el valor de TEAC, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$TEAC = \frac{IC50 \text{ DEL Trolox } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right)}{IC50 \text{ de la muestra } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

El valor de TEAC encontrado fue de 631.72 μmol de Trolox/ g de extracto. Este valor de equivalentes Trolox hace referencia a la cantidad de Trolox que

estaría presente en un gramo de extracto, fracción o compuesto. Obviamente entre mayor sea este valor de TEAC, la actividad antioxidante del AE es mayor, ya que este estándar presenta excelente actividad antioxidante (Trolox frente a ABTS).

Mientras en nuestro estudio, el AE crudo de *M. mollis* a una concentración de 50 ppm presentó un porcentaje de inhibición del 64.21 %, frente al radical ABTS, otra investigación sobre la misma especie, pero realizada con un extracto acuoso al 10%, reportó una inhibición del 92% (16). En cuanto, a los componentes mayoritarios identificados en cada AE y su posible relación con la capacidad antioxidante medida, encontramos que en el caso del del AE de *Minthostachys mollis* (orégano), se encontraron algunas similitudes, con relación a otros tipos de oréganos. Así, el orégano (*Lippia graveolens*) de dos regiones de Guatemala, Salamá y Zacapa (17) también presenta el 1,8-Cineol o Eucaliptol (6.39 %). Comparando con el estudio de (18) sobre *M. mollis* (Muña) extraídos de plantas recolectadas en el departamento de Cundinamarca, Colombia, se comparte la presencia del monoterpeno Pulegona y el sesquiterpeno Germacreno-D, compuestos asociados con la actividad antioxidante.

Otros tipos de orégano del género *Lippia* como en *L. multiflora* y *L. graveolens*, presentan componentes comunes, del tipo terpenos, entre los que se destacan: Pulegona, Cariofileno, Germacreno, y en menor proporción, Eucaliptol, Limoneno y Pineno (19). Una investigación donde se evaluó la efectividad antioxidante del



21

aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) al ser utilizado como antioxidante natural en dos sistemas alimenticios: aceite de oliva y aceite de soya sin refinar mostró un efectividad en la reducción de la oxidación reflejada en sus valores de peróxido, especialmente en el aceite de oliva(20,21), actividad similar a la del aceite esencial de *Lippia chequen*(22). Estudios recientes donde se evalúan las características antioxidantes del aceite crudo de *Schinus molle* L. (molle, aguaribay), se atribuyó esta actividad al Terpinen-4-ol, que es un alcohol no saturado con un doble enlace que lo califica como un potencial secuestrante de radicales libres y al Germacreno-D que es altamente reactivo y capturador de radicales libres, compuesto que está presente en el AE de *M. mollis* (23). Mientras que, estudios realizados por (24), muestran que a una concentración de 10 ppm, el AE de otra variedad de orégano presentó un TEAC de 4.023  $\mu\text{M}$  de Trolox por g, siendo sus compuestos mayoritarios *trans*-cinamaldehído, carvacrol, *p*-cimeno, y timol.

### Conclusiones

Los resultados indican que el aceite esencial foliar de la variedad de orégano *M. mollis* de nuestra región presenta un valor de  $\text{IC}_{50}$  de 22.7 ppm y un valor de TEAC equivalente a 631.72  $\mu\text{moles}$  de Trolox por cada gramo de aceite, observándose que este AE exhibe mayor actividad antioxidante frente al radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  que el AE de la especie *C. moritzianus*, el cual presenta actividad antioxidante pero en concentraciones superiores a 200 ppm.

### Referencias Bibliográficas

1.-Biocomercio Sostenible. Estudio del Mercado Colombiano de Aceites Esenciales.

Instituto de Investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt, Bogotá, Colombia. 2003 :16-41.

2.-Pastene E., GómezM.,Speisky H. Un sistema para la detección de antioxidantes volátiles comúnmente emitidos desde especias y hierbas medicinales. (2009). Quim. Nova, 32(2): 482-487.

3.- Geoffrey P. Complementos nutricionales y alimentos funcionales.Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.2007: 129-144.

4.-Taufert G.Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. Rev. Colombiana Quim.2005.34 (1), 43-55.

5.-Kulisic T.The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins. International Journal of Food Sciences and Nutrition.2007.58(2): 87-93.

6.-Schlesier K. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Rad Res. 2002.36 (2):177-187.

7.-Dang M.The influence of extracts and essential oils from various spices on the oxidation stability of lard. Journal of Food Sciences.2000.18 (Spec. Issue), 153-154.

8.-Sanchez C.Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. Food Sci. Tech. Int.2002. 8 (3):121-137.

9.-Prior R.Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary supplements.

Bistua :Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.2012 . 10 (1):12-23. Granados Conde C., Yáñez Rueda X., Santafé Patiño GG. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander.



Journal of Agricultural and Food Chemistry  
.2005.53 (8):3101-3113.

10.-Stashenko E.Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Scientia Et Technica.2007.13 (033), 165–166.

11.-Adams RP.Identification of essential oil components by gas chromatography/quadropole mass spectroscopy, Allured Publishing, Carol Stream, IL, **2007**: 804.

12.-RE R.Antioxidant activity and decolorisation assay applying and improved ABTS radical cation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999.26 (9/19), 1231-1237.

13.-Cano C. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (MUÑA). Rev. Peruana Med. Exp., Salud Pública.2008., 25(3): 298 -301.

14.Bandoni Al. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.2002:136-215.

15.-Vanegas G.,Yáñez X.. Estudio comparativo de la composición química del aceite esencial de *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) proveniente de cinco regiones de Norte de Santander. Bistúa:Revista de la facultad de Ciencias Basicas.2011.9(1):9-15.

16.-Castañeda C. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. 2008. 8 (1): 55.

17.-Quezada A.Evaluación del Rendimiento de Extracción del aceite esencial crudo de

Orégano (*Lippia Graveolens*) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto. Universidad De San Carlos De Guatemala. Facultad de Ingeniería, Guatemala.2008. Tesis. 60p.

18.-Olivero J.Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. Brazilian Journal of Pharmacognosy.2010.20(4): 568-574.

19.-Arcila C.. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes . ALAN. (2004)., 54(1):100-111.

20.-Guzman R.Antioxidant effect of oregano (*Lippia berlandieri* v. Shauer): essential oil and mother liquors. Food Chemistry.2006.(102): 335-335.

21.-Ávila, R.Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. Food Bioprocess Technol.2010. 3:434–440

22.-Carhuapoma M.. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Lippia chequen* (Molina) A. Gray "arrayán". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. (2006)Tesis, 80p.

23.-Guala M.Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por destilación al vacío. Información Tecnol.2009.20 (2), 83-88.

24.-Huang C.A study of four antioxidant activities and major chemical component analyses of twenty-five commonly used essential oils. J. Cosmet. Sci.2011.62(4):393-404.

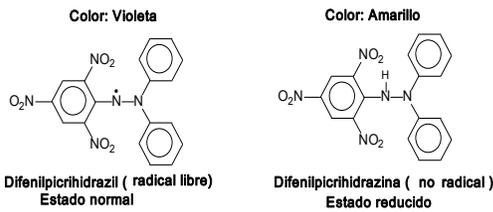


Figura 1. Estructura del DPPH en su forma normal y su forma reducida

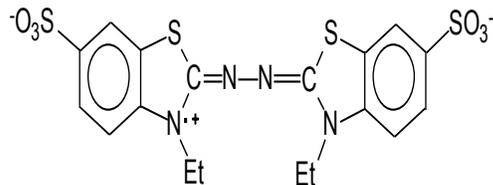


Figura 2. Estructura del catión radical ABTS<sup>+</sup>

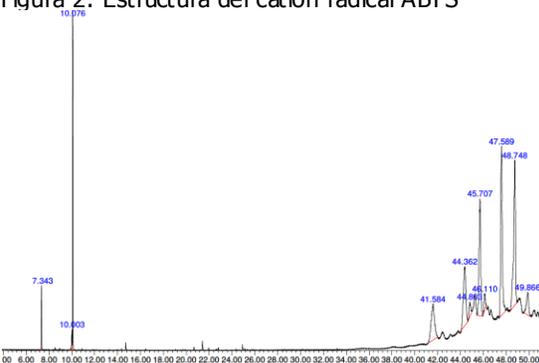


Figura 3. Perfil cromatográfico característico del AE de *M. mollis*.

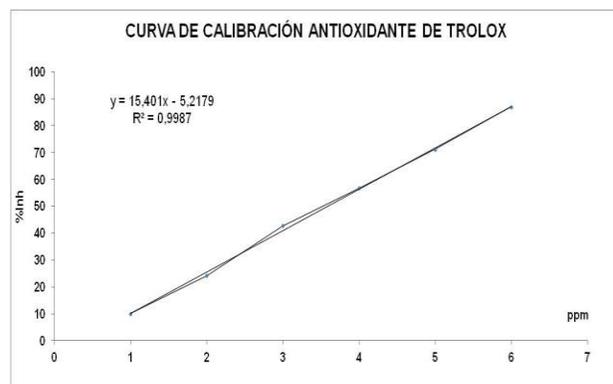


Figura 4. Grado de Inhibición (%) del ABTS<sup>+</sup> en función del estándar Trolox.

de las especies seleccionadas.

| Análisis                  | <i>Calycolpus moritzianus</i> (cínaro) | <i>Minthostachys mollis</i> (orégano) |
|---------------------------|--|---------------------------------------|
| Rendimiento del AE        | 1.2 %                                  | 0.6 %                                 |
| Densidad específica 20°C  | 0.92 g/ml                              | 0.92 g/ml                             |
| Índice de refracción 20°C | 1.472                                  | 1.477                                 |
| Rotación óptica a 20°C    | -6° a +5°                              | -2° a +3°                             |
| Solubilidad en etanol     | Positiva                               | Positiva                              |

| Num | t <sub>r</sub> | Compuesto                           | IK Teórica <sup>(1)</sup> | IK Exp <sup>(2)</sup> | Concentrac % <sup>(3)</sup> |
|-----|----------------|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 1   | 7.34           | α-Pineno <sup>(4)</sup>             | 939                       | 935                   | 1.73                        |
| 2   | 10.00          | Limoneno                            | 1029                      | 1031                  | 0.56                        |
| 3   | <b>10.07</b>   | <b>Eucalipto I<sup>(4)</sup></b>    | 1031                      | 1033                  | <b>10.04</b>                |
| 4   | <b>41.584</b>  | <b>Pulegona</b>                     | 1237                      | 1232                  | <b>9.84</b>                 |
| 5   | <b>44.361</b>  | <b>Germacreno-D</b>                 | 1485                      | 1480                  | <b>11.85</b>                |
| 6   | 44.803         | Biciclogermacreno                   | 1500                      | 1505                  | 1.83                        |
| 7   | 45.705         | Acetato de cariofileno              | 1701                      | 1710                  | 1.83                        |
| 8   | 46.110         | Longifolol                          | 1713                      | 1725                  | 1.77                        |
| 9   | <b>47.588</b>  | <b>Acetato de α-Eudesmol</b>        | 1795                      | 1790                  | <b>21.32</b>                |
| 10  | <b>48.749</b>  | <b>Acetato de (-)-Isolongifolol</b> | 1820                      | 1815                  | <b>20.94</b>                |
| 11  | 49.868         | Acetato de exo-Norbornanol          | 1823                      | 1825                  | 3.94                        |

Tabla 2.

Concentración relativa (%) de componentes del AE de *Minthostachys mollis*

(1) Adams, R. P. (2005).

(2) Calculados por CGAR-FID en columna HP-5.

(3) Concentración relativa, promedio de extracciones realizadas por triplicado.

(4) Se confirmaron comparando con patrones puros.

Tabla3. Capacidad antioxidante (% Inhibición) frente al radical DPPH de los AE

| AE  | <i>C. moritzianus</i> % Inh |       |         |            |        | <i>M. mollis</i> |
|-----|-----------------------------|-------|---------|------------|--------|------------------|
|     | Chiracota                   | Ocaña | Salazar | Pamplonita | Toledo | Pamplona         |
| 100 | 2.80                        | 7.02  | 1.05    | 1.78       | 1.05   | 8.12             |
| 150 | 4.28                        | 8.88  | 4.02    | 3.21       | 4.02   | 9.14             |
| 200 | 8.21                        | 8.90  | 5.26    | 5.71       | 5.26   | 10.16            |
| 250 | 10.71                       | 10.21 | 5.13    | 9.35       | 5.13   | 10.42            |
| 300 | 11.43                       | 10.91 | 7.86    | 9.36       | 7.86   | 11.02            |

Tabla 4. Capacidad antioxidante (% Inhibición) frente al ABTS<sup>+</sup> de los AE.

| AE  | <i>C. moritzianus</i> % Inh |       |         |            |        | <i>M. mollis</i> |
|-----|-----------------------------|-------|---------|------------|--------|------------------|
|     | Chirecota                   | Ocaña | Salazar | Pamplonita | Toledo | Pamplona         |
| 100 | 4.57                        | 14.21 | 11.67   | 15.73      | 15.83  | 77.83            |
| 150 | 5.00                        | 24.36 | 15.58   | 24.87      | 25.83  | 78.79            |
| 200 | 15.73                       | 33.50 | 34.77   | 32.99      | 36.06  | 78.90            |
| 250 | 39.09                       | 35.02 | 44.19   | 50.51      | 56.08  | 80.02            |
| 300 | 57.86                       | 40.61 | 48.47   | 67.27      | 68.00  | 82.26            |

22

Tabla 5. Capacidad antioxidante (% de Inhibición) del AE de *Minthostachys mollis*.

| AE <i>M. mollis</i> (Oregano) | 1ppm | 50ppm | 100ppm | 150ppm | 200ppm | 250ppm |
|-------------------------------|------|-------|--------|--------|--------|--------|
| % Inh                         | 3.65 | 64.21 | 77.83  | 78.79  | 78.90  | 80.02  |

Tabla 6. Análisis estadístico y valor IC<sub>50</sub> del AE de *M. mollis* expresado como capacidad antioxidante equivalente al estándar Trolox

| AE                         | A      | B      | R <sup>2</sup> | P        | IC <sub>50</sub> (ppm= μg/mL) | TEAC (μmol/g) |
|----------------------------|--------|--------|----------------|----------|-------------------------------|---------------|
| <i>M. mollis</i> (Oregano) | 5.9514 | 32.523 | 0.997          | 2.24E-05 | 22.7                          | 631.72        |

Tabla 1. Rendimiento y propiedades físicas de los AE

Bistua :Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.2012 . 10 (1):12-23. Granados Conde C., Yáñez Rueda X., Santafé Patiño GG. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander.