Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander (Colombia)

Clemente Granados⁽¹⁾, Xiomara Yáñez⁽²⁾ y Diofanor Acevedo⁽¹⁾

(1) Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Programa de ingeniería de Alimentos, Avenida el Consulado, Calle 30 No. 48-152. Cartagena, Bolívar-Colombia (e-mail: clementecondeg@gmail.com)

(2) Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología y Química, Extensión Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia.

*autor a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido Sep. 16, 2013; Aceptado Nov. 12, 2013; Versión final recibida Dic. 16, 2013

Resumen

Se ha determinado la composición química y la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de la especie *Myrcianthes leucoxyla* recolectada en el departamento de Norte de Santander (Colombia). La extracción del aceite se realizó por arrastre con vapor de agua y la identificación de los componentes mayoritarios se hizo por Cromatografía de Gases de Alta Resolución. Para determinar la actividad antioxidante de los aceites se usaron dos métodos: capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS^{•+} y capacidad de atrapamiento del radical DPPH. La inhibición con la metodología del radical DPPH no superó el 15%, mientras que con el radical ABTS^{•+} el porcentaje de inhibición fue alto. Esto sugiere que en el aceite esencial estudiado se encuentran presentes compuestos donadores de hidrógeno o electrones que pueden estabilizar al radical catiónico ABTS^{•+}.

Palabras clave: aceite esencial, actividad antioxidante, *Myrcianthes leucoxyla*, ABTS, DPPH.

Evaluation of Antioxidant Activity of the Essential Oil of *Myrcianthes leucoxyla* from Norte de Santander (Colombia)

Abstract

The chemical composition and the antioxidant activity of leaf essential oil of the species *Myrcianthes leucoxyla* collected in the department of Norte de Santander (Colombia) were determined. The extraction of the oil was performed by steam stripping and the identification of the major components was done by High Performance Gas Chromatography. To determine the antioxidant activity of the oil two methods were employed: entrapment capacity of the radical cation ABTS^{•+} and entrapment capacity of the radical DPPH. Inhibition with the DPPH-radical methodology did not exceed 15%, while with the radical ABTS^{•+} the percent inhibition was higher. This suggest that in the essential oil studied hydrogen donors or electrons which can stabilize the radical cation ABTS^{•+} are present.

Keywords: essential oil, antioxidant activity, *Myrcianthes leucoxyla*, ABTS^{•+}, DPPH.

INTRODUCCION

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de líquidos que presentan alta volatilidad, evaporándose al contacto con el aire obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Acevedo *et al.*, 2013a). Químicamente están formados por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos), sustancias azufradas y nitrogenadas (Muñoz *et al.*, 2007). El valor económico de los AE y su aplicabilidad industrial están directamente relacionados con su composición química y con la actividad biológica (Stashenko *et al.*, 2010). El creciente interés por el uso de extractos naturales antioxidantes que puedan sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos, resulta una alternativa prometedora para la prevención y tratamiento de enfermedades producidas por compuestos sintéticos (Olivero-Verbelet *et al.*, 2010). De hecho muchos autores han reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes y antiradicalarias de diferentes especias y aceites esenciales y en algunos casos, una aplicación directamente relacionada con los alimentos (Acevedo *et al.*, 2013b). La extracción de estos puede ser realizada por métodos convencionales como la destilación con arrastre de vapor (Acevedo *et al.*, 2013a).

Dada la complejidad química de los AE, la prueba de actividad antioxidante puede arrojar resultados diferentes dependiendo del método 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 son útiles para determinar la actividad de ambas especies (hidrofílica y lipofílica) y asegurar así una mejor comparación de los resultados (Schlesier *et al.*, 2002). *Myrcianthes leucoxyla* en Colombia se conoce con el nombre común de arrayán de clima frío (Santander y Tolima), arrayán grande (Boyacá), arrayán blanco (Cundinamarca), arrayán guayabo de castilla, guayabito, o guayabo liso (Magdalena). Es un árbol de 3 m de altura; nativo de los Andes y distribuido en Colombia, Ecuador y Venezuela. En Colombia se encuentra en las cordilleras Central y Oriental, en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, en los municipios que conforman la Sabana de Bogotá y en el flanco occidental de la cordillera Oriental incluyendo el municipio de Pamplona (Cardozo *et al.*, 2011; Infante-Betancouret *et al.*, 2008).

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-azinobis-3etil benzotiazolín-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 (Granados *et al.*, 2012). El segundo método se basa en la reducción del radical DPPH(2,2-difenil-1picrilhidracilo) por los compuestos 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 (Brand-Williams *et al.*, 1995). Se evaluó la capacidad antioxidante del AE foliar de la especie *M. leucoxyla*, conocida comúnmente como arrayán de clima frío, cuyos resultados podrían utilizarse como una alternativa en futuros estudios que busquen reemplazar los antioxidantes artificiales en alimentos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la Materia Prima Vegetal

La especie conocida comúnmente como arrayán de clima frío (*M. leucoxyla*) fue recolectada en el municipio de Pamplona, en la vereda de los Animes en la carretera que conduce de Pamplona a Bucaramanga. Se tomaron muestras pertenecientes al material foliar de las plantas adultas, hojas enteras y verdes. Las hojas fueron recolectadas en horas de la tarde y en época de invierno. Un ejemplar fue colectado por el botánico Luis Roberto Sánchez Montaña y reposa en el Herbario Regional Catatumbo-Sarare de la Universidad de Pamplona.

Extracción del AE

La obtención del AE se realizó por destilación con arrastre de vapor. Se empleó un equipo con manta de calentamiento para un balón de 5 litros (L). Se tomaron 400 g de material vegetal previamente identificado, seleccionado y pesado, los cuales fueron introducidos en un balón, al cual se adicionó 1 L de agua. El tiempo de extracción fue de dos horas y media. El AE se colectó en un recipiente tipo Dean Stark. Este se separó por decantación, fue medido con jeringa de 2 mL para establecer el rendimiento y almacenado en un vial de 4 mL de vidrio color ámbar (Stashenko *et al.*, 2010). El rendimiento del AE obtenido se calculó mediante la Ecuación 1:

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{(\text{mL de aceite esencial})}{\text{Peso en gramos del material vegetal}} \times 100\% \quad (1)$$

Determinación de propiedades físicas del AE

Al AE obtenido se le determinó densidad relativa a 20°C en picnómetro de 2 mL; rotación óptica en polarímetro; índice de refracción en Refractómetro ABBE; punto de ebullición en tubo de Thiele y solubilidad en etanol. Para este último se emplearon soluciones etanólicas de 20, 40, 60 y 80% v/v. Tomando 100 µL de cada solución, se agregaron lentamente pequeños volúmenes del AE (2 µL), hasta que la solución se tornó turbia (punto de saturación). Cada determinación se hizo por duplicado.

Análisis de los componentes mayoritarios del AE

Se realizó por Cromatografía de Gases de Alta Resolución (CGAR). 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 tomaron 30 µL del AE y se disolvieron en 1 mL de diclorometano. Se inyectó 1 µL en modo split (10:1). Los espectros de masas (EM) se obtuvieron por ionización electrónica con barrido automático. Cada EM fue comparado con los estándares de la base de datos y los datos reportados en la literatura (Adams, 2005). Para obtener los índices de Kováts (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. Para la identificación y cuantificación de los componentes de cada AE se utilizó el 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 (Stashenko, 2010).

Evaluación de la actividad antioxidante de cada AE

Se usaron dos métodos: Capacidad de atrapamiento del catión radical ABTS^{•+} y del radical DPPH[•]. De forma exploratoria, se realizaron ensayos preliminares a concentraciones entre 300 y 100 ppm para cada muestra de AE y de acuerdo con los resultados obtenidos se evaluó la capacidad antioxidante a concentraciones entre 1 y 100 ppm. Para ambos métodos se usó como estándar Trolox, cuya capacidad antioxidante se evaluó a las mismas condiciones de trabajo de las muestras. Los resultados son expresados como capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC; µmol de Trolox/gramos de sustancia evaluada) y capacidad antioxidante equivalente al ácido ascórbico (AAEAC; µmol de ácido ascórbico/gramos de sustancia evaluada). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Método del radical DPPH

Se empleó el método de Brand-Williams et al., 1995 con algunas modificaciones, 40 µL de muestra fueron adicionados a 960 µL de una solución metanólica de DPPH[•], y se evaluó la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH[•], por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 30 minutos de reacción a una longitud de onda de 517 nm, y se comparó el valor con la curva de referencia construida con Trolox como patrón primario, expresando los resultados como valores TEAC (µmol Trolox/100g de muestra).

La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Genesis 20 ThermoSpectronic modelo 4001/4, y se calculó el porcentaje de inhibición (% Inh) usando la Ecuación (2). Siendo A_{Muestra} la absorbancia del Aceite Esencial (AE), para lo cual se preparó una solución de 10000 ppm, 50 mg en 5 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO, Merck), y a partir de ésta, soluciones diluidas a diferentes concentraciones (1, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm), tomando en cada ensayo 40 µL y adicionando 960 µL de la solución del radical DPPH[•]. A_{Blanco} es la absorbancia del Blanco, preparado con 40 µL de la muestra y 960 µL de MeOH, y $A_{\text{Referencia}}$ es la absorbancia de la Referencia, preparada con 40 µL de DMSO y 960 µL de la solución del radical DPPH[•] (Granados, et al., 2012).

$$\% \text{Inh} = \left[1 - \frac{A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco}}}{A_{\text{Referencia}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Método del radical ABTS^{•+}

Se empleó el método de Re et al., 1999 con algunas modificaciones, 10 µL de muestra fueron adicionados a 990 µL de una solución de ABTS^{•+} y se evaluó la capacidad de cada muestra para atrapar el radical catiónico, por medio de la disminución en la absorbancia leída luego de 30 minutos de reacción, a una longitud de onda de 732 nm (Zapata, et al., 2013; Heras, et al., 2013). El valor de absorbancia se comparó

con la curva de referencia construida con Trolox como estándar y los resultados se expresan como valores TEAC (TroloxEquivalentAntioxidantCapacity), $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ g}$ de muestra.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Rendimiento del aceite esencial y propiedades físicas

En la Tabla 1, se muestra el rendimiento obtenido en la extracción del aceite esencial foliar (AE) y las propiedades físicas medidas para la especie vegetal analizada.

Tabla 1: Rendimiento y propiedades físicas del AE de *Myrcianthes leucoxyla*.

Análisis	Resultado
Rendimiento del AE	0,3%
Densidad específica 20°C	0,92 g/mL
Índice de refracción 20°C	1,4774
Rotación óptica a 20°C	-6° a +4°
Solubilidad en etanol	Positiva

El rendimiento de AE foliar de *M. leucoxyla* se encontró bastante bajo si se tiene en cuenta que el resultado promedio que se debe obtener, a nivel general, es entre el 1 y el 3%. Muñoz *et al.*, (2007) reportaron en su estudio rendimientos obtenidos en orégano común de 0,1%; orégano cimarrón (*Lippia origanoides*) de 2,3%; tomillo de 0,2% y orégano de castilla de 1,6%. Las densidades cercanas a 0,9 g/mL y los índices de refracción son característicos de los AE de diversas especies (Bandoni, 2002).

Componentes volátiles mayoritarios del AE de *Myrcianthes leucoxyla*

De acuerdo con el perfil cromatográfico de los componentes detectados por CGAR, se relacionan los 10 componentes mayoritarios del AE de arrayán de clima frío (*M. leucoxyla*) con una concentración superior al 1% (Tabla 2). Se destacan los monoterpenos α -Pino (28,4%) y 1,8-Cineol, *syn.* Eucaliptol (15,17%), de forma similar a lo que reporta Carhuapoma (2006), sobre los componentes del aceite de *Luma chequen* (Mirtácea), que también presenta en mayor cantidad los monoterpenos α -Pino (57,1%), 1,8-Cineol (12,1%) y Linalol (5,5%). Además el AE posee Cariofileno, un sesquiterpeno presente en otros AE con actividad antioxidante (Acevedo, *et al.*, 2013a, 2013b; Huang, 2011).

Tabla 2: Componentes mayoritarios y concentración (%) del AE de *Myrcianthes leucoxyla*

No.	t_R	Compuesto	$IK_{\text{Teórico}}^{(1)}$	$IK_{\text{Exp.}}^{(2)}$	Concentración (%) ⁽³⁾
1	7,159	α -Tuyeno	924	927	1,60
2	7,355	α -Pino ⁽⁴⁾	939	935	28,40
3	8,916	β -Mirceno	990	991	1,71
4	9,889	1,8-Cineol	1031	1033	15,70
5	19,797	α -Cubebeno	1345	1346	1,51
6	22,607	Z-Cariofileno	1408	1415	3,79
7	22,816	β -Humuleno	1436	1430	1,95
8	24,787	(-)-Spatulenol	1577	1575	3,30
9	24,929	Óxido de Cariofileno	1583	1590	3,04
10	25,534	Guaiol	1600	1610	3,13

El $IK_{\text{Teórico}}$ fue según Adams (2005), el IK_{Exp} corresponde a los datos calculados por CGAR-FID en columna HP-5, y al final se muestra la concentración relativa, promedio de extracciones realizadas por triplicado.

Evaluación de la actividad antioxidante del AE:

Resultados frente al radical DPPH: En la Tabla 3, se observa que a diferentes concentraciones entre 100 y 300 ppm el porcentaje de inhibición (% Inh.) con el método del radical DPPH, en ningún caso superó el 15%, razón por la cual se descartó continuar la evaluación de la actividad antioxidante con esta

metodología, teniendo en cuenta que se esperan valores de Inhibición superiores al 30% (Granados *et al.*, 2012). Se podría decir que en las muestras evaluadas no se encuentran presentes compuestos que puedan estabilizar al radical DPPH[•] (Torres *et al.*, 2007).

Tabla 3: Capacidad antioxidante (% Inhibición) frente al radical DPPH de los AE.

AE (ppm)	100	150	200	250	300
% Inh.	3,84	4,06	5,01	7,16	12,02

Resultados frente al radical catiónico ABTS^{•+}: Al realizar ensayos preliminares frente al radical ABTS^{•+}, entre concentraciones de 150 y 300 ppm se alcanzaron valores superiores al 80% de inhibición (Ver Tabla 4). Además se observó que a 100 ppm el porcentaje de inhibición (% Inh.) del AE de *M. leucoxylla* fue de 41,04, lo cual sugiere que en éste se encuentran presentes compuestos donadores de hidrógeno o de electrones que puedan estabilizar al radical catiónico ABTS^{•+}. Luego se realizaron ensayos con concentraciones menores de AE de 1 y 50 ppm para determinar la concentración mínima a la cual el AE mantiene su capacidad antioxidante.

Tabla 4: Capacidad antioxidante (% Inhibición) frente al ABTS^{•+} del AE de *Myrcianthes leucoxylla*.

AE (ppm)	1	50	100	150	200	250	300
%Inh.	2,02	24,06	41,04	86,60	87,99	88,00	89,99

En el caso del AE de *Minthostachys mollis* sólo presentó actividad antioxidante a partir de 500 ppm cuando se alcanzan porcentajes de inhibición superiores al 60%, lo cual contrasta con el arrayán de clima frío, el cual comienza a tener porcentajes inhibitorios del 40% a partir de 100 ppm de AE (Granados, *et al.*, 2012).

En general, los valores de inhibición del radical DPPH[•] fueron menores en comparación a los valores frente al radical ABTS^{•+}, sugiriendo que los compuestos antioxidantes presentes en el AE son altamente hidrofílicos siendo más sensibles a la técnica del ABTS^{•+} (Guala, 2009; Heras, 2013; Torres, *et al.*, 2013; Zulueta, *et al.*, 2009).

Con la gráfica % Inhibición del AE vs. Logaritmo (Log₁₀) de la concentración fue calculado el IC₅₀ para el AE. El valor IC₅₀ (concentración a la cual el % Inh. es igual a 50) para el AE de *M. leucoxylla* fue de 118.4 ppm. Este valor se convierte en Equivalentes Trolox (TEAC-por sus siglas en inglés, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$TEAC = \frac{IC_{50} \text{ DEL Trolox } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right)}{IC_{50} \text{ de la muestra } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)} \quad (3)$$

El valor TEAC fue de 121.09 μmol de Trolox/ g de extracto, el cual es menor que el reportado para el orégano, una especie de referencia con reconocida capacidad antioxidante (Granados, *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La actividad antioxidante encontrada en el AE de *M. leucoxylla* posibilita la realización de posteriores estudios, en la búsqueda de su aplicación en la industria de alimentos como posible sustituto de los antioxidantes sintéticos, dada la potencial capacidad para atrapar radicales libres.

REFERENCIAS

- Acevedo, D., M. Navarro y L. Monrroy, Composición química del aceite esencial de hojas de Orégano (*Origanum vulgare*), Información Tecnológica: 24(4), en prensa (2013a).
- Acevedo, D., M. Navarro y L. Monrroy, Composición química del aceite esencial de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis* L.), Información Tecnológica: 24(4), en prensa (2013b).
- Adams, R., Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 469p, Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, USA (2005).

- Bandoni, A.I., Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica, 1ª Ed., 250p, Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina (2002).
- Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier y C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LebensmittelWissenschaft und Technologie*: 28(1), 25-30 (1995).
- Cardozo, R.H., y otros diez autores, Especies útiles en la Región Andina de Colombia. Tomo I, 1ª Ed, 179-188, Imprenta Nacional de Colombia, 179-188, Bogotá, Colombia (2011).
- Carhuapoma, M. y otros tres autores, Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray "arrayán", *Ciencia e Investigación*: 8(2), 73-79 (2005).
- Granados, C., X. Yáñez, y G. Santafé, Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpusmoritzianus* y *Minthostachysmollis*, de Norte de Santander, *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*: 10(1), 12-23 (2012).
- Guala, M., Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por destilación al vacío, *Información Tecnológica*: 20(2), 83-88 (2009).
- Heras, I., Alvis, A. y G. Arrazola. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). *Información Tecnológica*: 24 (5), 93-102 (2013).
- Huang, C.A., Study of four antioxidant activities and major chemical component analysis of twenty-five commonly used essential oils, *J. Cosmet. Sci.*: 62(4):393-404 (2011).
- Infante-Betancour, J., A. Jara-Muñoz y O. Rivera-Díaz, Árboles y arbustos más frecuentes de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, 1ª Ed., 31p., Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia (2008).
- Muñoz, A. y otros seis autores, Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de Timol y Carvacrol, *Scientia et Technica*: 13(33), 125-128 (2007).
- Olivero-Verbel, J. y otros cuatro autores, Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants, *Rev. bras. Farmacogn*: 20(4), 568-574 (2010).
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang y C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radicals in Biology and Medicine*: 26(9/10), 1231-1237 (1999).
- Schlesier, K. y otros tres autores, Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods, *Free Rad Res.*: 36(2):177-187 (2002).
- Stashenko, E. y otros seis autores, *Lippiaoriganoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis, *J. Sep. Sci.*: 33(1), 93-103 (2010).
- Torres, O. y otros tres autores, Estudio químico y obtención de principios activos de la especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae) del Alto Sinú, *Scientiae et Technica*, 13(133), 55-58 (2007).
- Zapata, K., Cortes, F.B. y B.A., Rojano. Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium maraca*), *Información Tecnológica*: 24(5), 103-112 (2013).
- Zulueta, A., M.J. Esteve y A. Frígola, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food Chemistry*: 114(1), 310-316 (2009).