

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro* DE LOS ACEITES VOLÁTILES DE CUATRO PLANTAS DE USO TRADICIONAL MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE ACEITE

RESUMEN

Se evaluó efecto retardador de la degradación oxidativa de lípidos, presentado por varios aceites esenciales en un sistema lipídico modelo. La oxidación se indujo por exposición a la radiación UV-B.

Se determinaron las siguientes disminuciones en la concentración de hexanal, sustancia empleada para medir la actividad antioxidante de los aceites esenciales agregados al aceite de girasol en concentraciones de 10 y 20 g/Kg: 48 y 50% para el cilantro (*Coriander sativum* L.), 31 y 50% para el romero (*Rosmarinus officinalis* L.), 50 y 63% para *Lippia alba* (Mill.), y 23 y 46% para el ylang-ylang (*Cananga odorata*) respectivamente.

PALABRAS CLAVES: Antioxidantes, Aceites volátiles, Peroxidación de lípidos

ABSTRACT

In this work, we tested several essential oils for their effect to retard oxidative degradation, accelerated by UV- exposure.

*The antioxidant activity of essential oils was evaluated by measuring the change in the hexanal content found in the lipid matrix during lipid peroxidation. The decreases in hexanal concentration caused by the addition of essential oils at 1 and 2 % (w/w) to sunflower oil were as follows: 48 and 50% for cilantro (*Coriander sativum* L.), 31 and 50% for rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), 60 and 68% for *Lippia alba* (Mill.) and 23 and 46% for ylang-ylang (*Cananga odorata*), respectively.*

KEYWORDS: *Antioxidants, oils volatile, lipid peroxidation*

1. INTRODUCCIÓN

La exposición a la radiación ultravioleta (UV) ha sido asociada con varios problemas de salud en los seres humanos tales como quemaduras solares, envejecimiento prematuro, cataratas, inmunosupresión y cáncer de piel. De este último se conoce que los casos han amentado a más de 900.000 por año. Este incremento se asocia con la sobreexposición a este tipo de radiación [23].

El componente UV de la luz solar ha sido implicado como un factor determinante de varias patologías relacionadas [2, 8, 25]. Una hipótesis unificada para estos efectos producidos por este tipo de radiación es:

La luz UV induce la formación de radicales; Las defensas antioxidantes contrarrestan los radicales, pero altas dosis de luz UV conducen a disminuir notoriamente las defensas antioxidantes; Los radicales, producto de la radiación ultravioleta, pueden causar daños a componentes celulares tales como proteínas, lípidos y ADN, lo que origina alteraciones en las funciones celulares [2].

NELSON CONTRERAS C.

Químico, Ms.C.
Profesor Auxiliar
Universidad Tecnológica de Pereira
ncontrer@utp.edu.co

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ

Químico, Ph.D.
Profesor Titular
Universidad Industrial de Santander
rene@tucan.uis.edu.co

ELENA E. STASHENKO

Química, Ph.D.
Profesora Titular
Universidad Industrial de Santander
elena@tucan.uis.edu.co

Las plantas y las sustancias que de ellas se derivan han sido utilizadas por varios siglos en campos como la medicina y la bioquímica [10, 24]; su uso en perfumería y conservación de alimentos es también importante. Recientes investigaciones están encaminadas a dilucidar actividades benéficas en procesos biológicos de animales y en los seres humanos [12-14].

Ante la creciente oposición al uso de antioxidantes sintéticos en la industria, las investigaciones se han encaminado a buscar productos naturales que presenten actividades antioxidantes similares o mayores y que puedan en poco tiempo sustituirlos [3, 6]. Además se busca aprovechar la biodiversidad de nuestro país y darle valor agregado a las especies materia de estudio

buscando nuevos usos e incentivando su producción a futuro.

Con esta investigación se desarrolló una metodología reproducible y altamente sensible que permitiera determinar la actividad antioxidante *in-vitro* de sustancias de origen natural en sistemas lipídicos sometidos a

condiciones oxidantes, en este caso, a la radiación UV. Una aplicación importante de esta metodología está en la búsqueda de sustancias que eviten o disminuyan los procesos oxidativos. Se escogieron las plantas de Ylang-Ylang (*Cananga Odorata*), *Lippia alba* (Mill), romero (*Rosmarinus officinalis*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), ya que estudios realizados por Stashenko y colaboradores [9, 21, 22] demostraron el efecto protector de éstas en el proceso de degradación oxidativa, ya sea por degradación térmica o inducida por el reactivo de Fenton, y se presentaba interés de estudiar su actividad protectora en sistemas lipídicos, sometidos a la radiación UV.

Una vez determinada la actividad antioxidante de estos aceites esenciales, ésta fue comparada con la de la vitamina E, la cual es la sustancia natural más conocida que presenta alta actividad antioxidante [1, 17], y con la de un antioxidante sintético a saber, el butilhidroxianisol (BHA), muy utilizado en la industria de conservación de alimentos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales.

La vitamina E y la pentafluorfenilhidracina (PFPH) fueron suministradas por Aldrich Chemical Co. Inc. (Milwaukee, WI, USA); el ter-butilhidroxianisol (BHA) fue adquirido de Merck (Darmstadt, Germany). El aceite de girasol de marca comercial "Girasoli" fue obtenido en el mercado local. Los aceites esenciales de ylang-ylang (*Cananga odorata*), *Lippia alba* (Mill), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y cilantro (*Coriandrum sativum*) se obtuvieron a partir de plantas conseguidas en el mercado local, utilizando para su extracción el método de hidrodestilación.

2.2. Métodos

2.2.1. Sistema lipídico modelo para el estudio de la actividad antioxidante.

Este sistema consistió en una matriz lipídica (aceite de girasol) la cual fue sometida a la acción de los rayos UV durante un tiempo seleccionado experimentalmente, el cual permitió obtener el hexanal (producto final de la degradación oxidativa del ácido linoléico, ácido graso presente en mayor proporción en el aceite de girasol) en cantidades apreciables para su posterior determinación por HRGC/ECD en forma de su derivado hidrazónico. En el proceso de estandarización del método se tuvo en cuenta el tiempo de irradiación que presentó mayor generación de hexanal y la cantidad de matriz lipídica suficiente, para garantizar una buena reproducibilidad [2,7,24].

2.2.2. Derivación y extracción del hexanal en el sistema lipídico modelo.

Los compuestos carbonílicos generados en el proceso de peroxidación lipídica son muy volátiles y altamente solubles, lo cual es un inconveniente para nuestro objetivo de lograr una alta selectividad, una buena reproducibilidad y una mejor sensibilidad en la determinación de estas sustancias. Es por ello que su análisis se realizó acompañado de la derivación, empleando como agente derivante la pentafluorfenilhidracina (PFPH), obteniéndose pentafluorfenilhidrazonas de los compuestos carbonílicos generados, los cuales tienen baja solubilidad en agua, son semivolátiles y presentan una alta respuesta a detectores específicos como el detector de captura de electrones (ECD) y el detector de nitrógeno y fósforo (NPD) en el análisis por cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) con lo cual se mejoran ostensiblemente los niveles de sensibilidad requeridos para su determinación, ya que estos compuestos, por lo general, se encuentran presentes al nivel de trazas en los productos oxidativos [19,20].

Después de ser irradiados por el espacio de tiempo que generaba una cantidad apreciable de hexanal (24 horas), los tubos de poli(propileno), que contenían las muestras de aceite (1 gramo), se bajaron del reactor UV y se sometieron a enfriamiento durante 5 minutos a 4°C en una nevara industrial marca INDUFRIAL. A cada muestra, se le realizó el proceso de derivación con PFPH dejando un lapso de media hora entre el tratamiento de cada muestra; después de esto, se adicionaron 160 µL de solución de PFPH en hexano (80 mg de PFPH en 5 mL de hexano), se agitaron y se aforaron a 2 mL en hexano. Las mezclas se agitaron por espacio de 1 min a 1800 rpm. Después de la agitación, las mezclas se envasaron, y se inyectó luego 1 µL al HGRC/ECD, para su análisis cromatográfico.

2.2.3. Validación del sistema lipídico modelo

Para la validación del método de antioxidación se evaluaron los efectos protectores de la vitamina E y el BHA "dopando" 1 g de aceite de girasol con cada una de estas sustancias en concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2 y 4% (p/p). Las muestras fueron sometidas al proceso de degradación oxidativa, acelerada por la radiación UV. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

El grado de protección de los antioxidantes sobre el sistema lipídico, se calculó con base en la generación del hexanal, empleando la siguiente relación:

$$\text{Grado de protección (\%)} = \frac{A_o - A_x}{A_x} \cdot 100$$

Donde:

A_0 : área del pico cromatográfico del hexanal medida en el sistema sometido a radiación UV sin antioxidante.

A_x : área del pico cromatográfico del hexanal medida en el sistema sometido a radiación UV con antioxidante.

2.2.4. Evaluación de la actividad antioxidante de los aceites esenciales en estudio.

Una vez establecidas las condiciones experimentales (tiempo de exposición a la radiación UV del sistema lipídico y concentración de reactivos), que permitieron obtener resultados reproducibles en el proceso de degradación de ácidos grasos y, por consiguiente, en la determinación de la concentración de los productos finales, se procedió a evaluar la posible actividad antioxidante in vitro de los aceites esenciales que se mencionaron anteriormente, los cuales fueron obtenidos en el Laboratorio mediante la técnica de hidrodestilación. El material vegetal en estudio se obtuvo en el comercio local. Los AE de las plantas en estudio se obtuvieron por la técnica de hidrodestilación. Inicialmente, se tomó aproximadamente 1 kg de material vegetal fresco, previamente picado, el cual se colocó en un balón de 6L, a éste se agregaron 4L de agua destilada hasta alcanzar la superficie del material vegetal. El sistema se sometió a calentamiento hasta ebullición por espacio de 2 horas. Los AE obtenidos se colectaron y secaron con sulfato de sodio anhidro durante 24 horas. Después de esto, los AE se almacenaron en frascos ámbar y fueron refrigerados a 4°C para su posterior análisis y pruebas de actividad antioxidante. Los ensayos para determinar la posible actividad antioxidante de los diferentes aceites esenciales son los mismos que se utilizaron para evaluar el sistema lipídico modelo. En todos los ensayos se utilizaron blancos de aceite de girasol irradiados por el tiempo determinado experimentalmente.

2.2.5. Análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico se realizó en un cromatógrafo de gases HP-5890 Series II, equipado con un puerto de inyección split/splitless, columna HP-5 (30 m, 0.25 mm di, 0.25 μ m f.e.) y detector de captura de electrones (ECD, ^{63}Ni), un inyector automático HP 7683, y un sistema de datos HP ChemStation HP Rev. A.06.03 [509]. Las temperaturas del inyector y detector permanecieron a 260 y 280°C, respectivamente. La programación de temperatura de la columna fue de 100°C (5 min) hasta 250°C (2 min) por 10°C/min. Se utilizó helio como gas de arrastre (99.995%, Aga-Fano S.A.) con el flujo en la columna de 1.0 mL/min (70 °C), relación split 10:1 y como gas auxiliar en el ECD argón/metano (9:1) con flujo de 20 mL/min.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se empleó el aceite de girasol, por su alto contenido de ácido linoléico, para determinar el tiempo de exposición del sistema lipídico a la acción de la radiación UV.

En la Figura 1, se puede observar, que a medida que aumenta el tiempo de exposición del aceite de girasol a la luz UV, la cantidad del hexanal en el sistema lipídico aumenta, pero es de resaltar, que entre las 24 y 72 horas de exposición, este incremento no es sustancial, es por ello que se determinó fijar el tiempo de irradiación del sistema lipídico modelo en 24 horas, para luego determinar el efecto protector de aceites esenciales contra la degradación oxidativa del aceite de girasol.

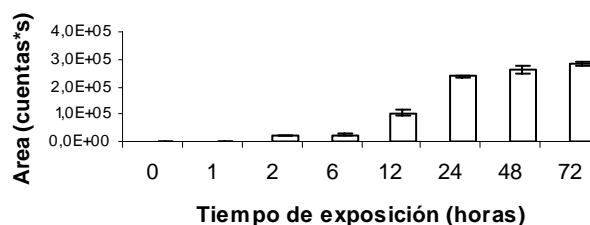


Figura 1. Generación de hexanal en el aceite de girasol, sometido a la irradiación con luz UV durante diferentes tiempos de exposición.

La cuantificación del hexanal se basó en la determinación de las áreas cromatográficas generadas por el derivado PFPH del hexanal, al ser éste el compuesto carbonílico volátil generado en mayor proporción durante la degradación oxidativa del aceite de girasol, lo que también fue demostrado en los estudios realizados por Fuentes [7], y otros autores [11, 16, 22]. Este compuesto fue identificado comparando su tiempo de retención (t_R), con los de los derivados PFPH obtenidos a partir de estándares de compuestos carbonílicos volátiles (Ver Figura 2).

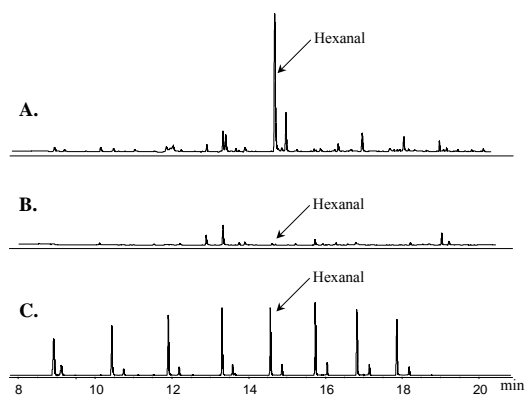


Figura 2. Perfiles cromatográficos típicos en la columna HP-5 (30 m) usando ECD de: A. Aceite de girasol irradiado durante 24 horas. B. Aceite de girasol sin irradiar, y C. Derivados hidrazónicos de aldehídos saturados C_1-C_9 .

La vitamina E ha sido ampliamente estudiada, por ser el mayor antioxidante (AO) en la membrana celular, y es vista como la "última línea de defensa" contra la peroxidación de los lípidos de la membrana. Es uno de los AO lipídicos más potentes *in vitro* y el más importante de los que se encuentran en la circulación sanguínea [17]. Además de su acción como AO, la vitamina E puede funcionar como protector solar ya que estudios recientes demuestran que absorbe la radiación UV-B [4]. En cuanto al BHA, se ha mencionado, que es uno de los AO sintéticos más utilizados en la industria de alimentos, pero recientes investigaciones están encaminadas en la búsqueda de AO de origen natural, que puedan reemplazar este tipo de AO sintéticos, ya que los sintéticos han presentado efectos secundarios que potencialmente pueden ser nocivos para la salud humana, y también alterar la naturaleza de los alimentos en donde se encuentran mezclados [11,16]. Se determinó que la adición de la vitamina E y el BHA, al aceite de girasol en concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2 y 4% (w/w) disminuye la generación de hexanal, obteniéndose, para la vitamina E, un efecto protector de 84 % para la concentración de 2% (p/p), y para el BHA, un efecto protector de 66 % para la misma concentración (Figura 3).

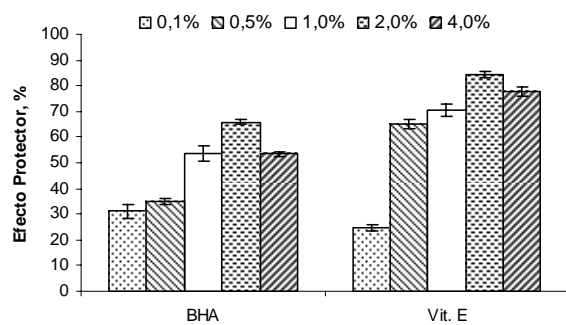


Figura 3. Evaluación del efecto protector de la vitamina E y del BHA, contra la peroxidación lipídica del aceite de girasol, acelerada por la radiación UV.

En cuanto al efecto protector de los aceites esenciales (AE) en estudio, en la Tabla 1 se observa que los aceites de ylang-ylang, romero, Lippia y cilantro, en concentraciones del 2% (p/p) presentaron el efecto protector más alto (46, 50, 68.3 y 50%, respectivamente).

De acuerdo con los resultados obtenidos se observó un buen efecto protector de estos AE, pero ninguno de ellos superó la actividad antioxidante ejercida por la vitamina E en concentración de 2% (84%). Con respecto al BHA, su efecto protector (66%) sólo fue superado por el AE de Lippia (68.3%), en concentración de 2 % (p/p).

Todos los AE en estudio mostraron buenos efectos protectores, los cuales no están muy lejos de los ejercidos por los AO sintéticos. Esto es un buen indicio, ya que además de los resultados de estudios realizados por Fuentes, Delgado y Salgar, en el Laboratorio de

Cromatografía de la UIS [5, 9, 15], en los cuales la degradación del aceite de girasol se realizó por termodegradación, también se muestra la eficacia de los AE en la protección del sistema lipídico modelo sometido a otro tipo de degradación como lo es la radiación UV.

Concentración, % (p/p)	Efecto protector, %		
	Promedio	σ	CV, %
Cilantro			
0.1	10.1	0.22	2.15
0.5	36	1.01	2.84
1.0	48	1.21	2.51
2.0	50	1.12	2.24
4.0	44	1.53	3.52
Romero			
0.1	12.6	0.55	4.35
0.5	31	1.29	4.12
1.0	32	1.21	3.80
2.0	50	2.75	5.49
4.0	41.3	0.92	2.23
Lippia			
0.1	53	2.23	4.23
0.5	58	1.74	2.98
1.0	60	1.71	2.86
2.0	68.3	0.65	0.95
4.0	1.00	0.02	2.00
Ylang-Ylang			
0.1	7.3	0.23	3.15
0.5	11.9	0.17	1.45
1.0	23	1.28	5.60
2.0	46	1.58	3.42
4.0	32.1	0.76	2.37

CV: Coeficiente de variación
 σ : Desviación estándar

Tabla 1. Efecto protector de los aceites esenciales en estudio, sobre el sistema lipídico modelo (aceite de girasol).

Para futuras investigaciones sería interesante evaluar la actividad antioxidante de aceites volátiles de otras plantas nativas de nuestro territorio. Los beneficios de plantas que muestren buenos efectos protectores pueden incrementar su valor en el mercado y ser fuente de ingresos para la economía regional y nacional. Además de esto, establecer cuál o cuales son los componentes de los aceites volátiles en estudio que presentan actividad antioxidante, buscar rutas para aislar estos componentes y evaluar su actividad protectora.

4. CONCLUSIONES

Se validó el sistema lipídico modelo (aceite de girasol), en la determinación del grado de peroxidación lipídica, teniendo en cuenta las áreas cromatográficas del derivado hidrazónico del hexanal generadas en el proceso de degradación oxidativa, y evaluando el efecto protector que la vitamina E y el BHA, producen en el aceite de girasol sometido a condiciones oxidantes generadas por la radiación UV.

Se evaluó el efecto protector sobre el sistema lipídico modelo, de los cuatro aceites volátiles empleados en el presente estudio: cilantro, romero, ylang-ylang y Lippia. Los resultados obtenidos muestran que el AE de Lippia mostró el mayor efecto protector (68.3%).

De los aceites volátiles evaluados, ninguno superó el efecto protector de la vitamina E (84%), pero el aceite volátil de Lippia mostró mayor efecto protector (68.3%) que el BHA (65.9%). Los otros tres aceites volátiles mostraron un efecto protector cercano al 50%. Estos resultados demuestran que las cuatro especies en estudio presentan actividad antioxidante, lo cual puede derivar en darle valor agregado a estas plantas y ampliar su uso en otros campos aparte del alimenticio, tales como la medicina o la bioquímica, por mencionar algunos.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero brindado por COLCIENCIAS a través del proyecto 1102-05-267-97

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BARCLAY L, Vinqvist M.R, Antunes F, Pinto R.E. Antioxidant activity of vitamin E determined in a phospholipid membrane by product studies: avoiding chain transfer reactions by vitamin E radicals. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; 119: 5764- 65.
- [2] BOUHAMIDI R, Prevost V, Nouvelot A. High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation. *Life Sciences.* 1998; 321: 31-35.
- [3] BRANEN A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS.* 1975; 25: 59-62.
- [4] CAMACHO F. Antiguos y nuevos aspectos de la fotoprotección. *Revisión.* 2001; 4 (7): 441-48.
- [5] DELGADO W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de tres aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Umbelliferae. Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander. 2002.
- [6] DESMARCHELIER C, Ciccía G. Antioxidantes de origen vegetal. *Ciencia hoy.* 1998; 8: 32-34.
- [7] DE ZWART L, Meerman J, Commandeur J, Vermeulen N. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26 (1-2): 202-26.
- [8] FUCHS J, Packer L. Oxidative stress in dermatology. New York, Marcel Dekker Inc., 1993, p. 544.
- [9] FUENTES H. Monitoreo de la termodegradación de los ácidos grasos en los aceites vegetales de consumo humano por medio de cromatografía de gases de alta resolución y evaluación in-vitro de la actividad antioxidante de productos naturales, Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander. 1999.
- [10] GRAIG W. Phytochemicals: Guardians of our health. *J. Of the Am. Dietetic Association.* 1997; 97 (10): 199-204.
- [11] LIN F, Warner C. R, Fazio T. Alteration of phenolic antioxidants in heated vegetable oil. *JAOCS.* 1981; 58(7): 789-92.
- [12] LOPEZ-BOTE C, Rey A, Sanz M, Gray JI, Buckley DJ. Dietary vegetable oils and α -tocopherol reduce lipid oxidation in rabbit muscle. *J. Nutr.* 1997; 127: 1176-82.
- [13] NISSEN L, Mansson L, Bertelsen G. Huynh-Ba T, Skibsted LH. Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by spin resonance spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48 (11): 5548-56.
- [14] POVILAITYTE V, Venskutonis P. R. Antioxidative activity of purple perill (Perilla frutescens L.), moldavian dragonhead (Dracocephalum moldavica L.), and roman chamomile (Anthemis nobilis L.) extracts in rapeseed oil. *JAOCS.* 2000; 77 (9): 951-56.
- [15] SALGAR W. Evaluación en dos sistemas lipídicos modelo de la actividad antioxidante in-vitro de aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a la familia Labiatae. Tesis de Maestría, Universidad Industrial de Santander. 2002.
- [16] SANHUEZA J, Nieto S, Valenzuela A. Thermal stability of some commercial synthetic antioxidants. *JAOCS.* 2000; 77 (9): 933-36.
- [17] SASKIA A, Koymans LM, Bast A. Molecular pharmacology of vitamin E: Structural aspects of antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine,* 1993; 15(3): 311-28.
- [18] SMITH M, Brown R, Smullin S, Eager J. Photosensitized peroxidation of lipids: An experimental using $^1\text{H-NMR}$. *J. Chem. Educ.* 1997; 74 (12): 1471-76.
- [19] STASHENKO E. E, Ferreira M, Sequeda L, Cervantes M, Mateus A, Martínez J. R. Desarrollo de un método para monitoreo de la degradación oxidativa de lípidos y evaluación de la actividad antioxidante de productos naturales. *Revista Arte y Ciencia Cosmética.* 1997; 8 (12): 20-27.

- [20] STASHENKO E. E, Ferreira M, Sequeda L, Martínez J. R, Wong J. Comparison of extraction methods and detection system in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A.* 1997; 779 (1) : 360-69.
- [21] STASHENKO E. E, Martínez J. R, Macku C, Shibamoto T. HRGC and GC/MS Analysis of essential oils from Colombian Ylang-Ylang. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1993; 16 (7): 441-44.
- [22] STASHENKO E. E, Quiroz N, Martínez J. R. HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD Study of Colombian Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *J. High Resolut. Chromatogr.* 1996; 19 (6): 353-58.
- [23] UDDING-LOUWRIER S, Bajjards R, De Jong E. New developments in radiation-curable powder coatings. *J. Coating Tech.*, 2000; 72 (904): 71-82.
- [24] WETTASINGHE M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47 (5): 1801-04.
- [25] WOOD L, Fitzgerald D, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Lipid peroxidation as determined by plasma isoprostanes is related to disease severity in mild asthma. *Lipids.* 2000; 35 (9): 967-74.