

## COMPOSICIÓN Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ESPECIES AROMÁTICAS Y MEDICINALES CON ALTO CONTENIDO DE TIMOL Y CARVACROL

### RESUMEN.

Se determinó la composición química de extractos de seis especies vegetales (tomillo, orégano común, cimarrón, de castilla, rastrero y mejorana) y cuatro aceites esenciales obtenidos por destilación-extracción simultánea con solvente (SDE) y hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), respectivamente. La separación, detección e identificación de los compuestos se realizó por GC-MS y por comparación de sus espectros de masas con los de patrones y de las bases de datos e índices de retención de Kovats. Se evaluó la capacidad de atrapamiento del catión-radical ABTS<sup>+</sup> [ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfónico)] por los aceites esenciales.

**PALABRAS CLAVE.** MWHD, SDE, timol, carvacrol, aceites esenciales, ABTS<sup>+</sup>.

### ABSTRACT.

*Extracts and essential oils rich in thymol and carvacrol were obtained by simultaneous distillation-solvent extraction (SDE) and microwave-assisted hydrodistillation (MWHD) from thyme, common and wild oregano, spanish oregano, and marjoram. Compound separation and identification were performed by GC-MS (EI,70 eV), based on chromatographic (Kovats indices) and spectral (comparison with standard and database spectra) criteria. The antioxidant activity of essential oils was evaluated using the ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical-cation decolorization assay*

**KEYWORDS:** MWHD, SDE, thymol, carvacrol, essential oils, ABTS<sup>+</sup>.

**AMNER MUÑOZ ACEVEDO\***

Químico, M.Sc.; Estudiante de Doctorado

**MARTHA L. CASTAÑEDA\***

Estudiante de Química

**KATERINE M. BLANCO\***

Estudiante de Química

**CAROL Y. CARDENAS\***

Estudiante de Química

**JOHAN A. REYES\***

Estudiante de Química

**VLADIMIR KOUZNETSOV\*\***

Químico, Ph.D.

Profesor titular Escuela de Química

**ELENA E. STASHENKO\***

Química, Ph.D.

Profesor titular Escuela de Química

elena@tucan.uis.edu.co

\*Laboratorio de Cromatografía,

\*\*Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Centro de Investigación en Biomoléculas – CIBIMOL y Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander

## 1. INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AEs) de plantas aromáticas y medicinales presentan bioactividades notables *e.g.* propiedades antifúngicas, antibacteriales y antioxidantes (AO), atrayendo la atención de químicos de productos naturales y de importantes sectores de la industria farmacéutica, de perfumes, cosmética y de alimentos, entre otras, por sus posibles y viables aplicaciones [1,2].

El timol y el carvacrol son compuestos fenólicos naturales, considerados como posibles antioxidantes, agentes antifúngicos y antibacteriales, presentes en cantidades significativas en los AEs del género *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra* y *Lippia*, especies ampliamente utilizadas como especias y tés herbarios [3].

Debido a la relación existente entre estos dos compuestos y sus potenciales actividades, muchos estudios se han enfocado en la determinación de la composición química de especies pertenecientes a estos géneros. Existen básicamente dos tipos de orégano: orégano europeo (mejorana, orégano común, etc.) nativo de la región mediterránea y el orégano americano (Suramérica o México) perteneciente al género *Lippia* (*L. organoides*, *L. graveolens*, entre otras), los cuales se destacan por su alto contenido de compuestos fenólicos (timol y carvacrol) [4,5].

Recientemente, se ha incrementado la búsqueda de antioxidantes de origen natural para ser usados en alimentos y como base de nuevos fármacos y así reemplazar los antioxidantes sintéticos debido a las

restricciones de carcinogenicidad que éstos presentan, lo cual lo hace un tema importante para el estudio de diversas especies autóctonas, ricas en timol y carvacrol, como posibles fuentes con propiedades biológicas beneficiosas [6].

## 2. METODOLOGÍA

**2.1 Extractos y AEs.** Los extractos de las 6 especies fueron obtenidos por SDE ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Con base en los resultados obtenidos mediante la técnica SDE, se seleccionaron 4 especies vegetales (Orégano común, cimarrón y de Castilla y Tomillo) con alto contenido de carvacrol y timol, y se aislaron sus AEs mediante MWHD.

**2.2 Composición química.** La composición química de los AEs y los extractos se determinó mediante el análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), utilizando la columna capilar DB-5 (60m) como sistema de separación. Los compuestos de las mezclas se identificaron con base en sus espectros de masas (EI, 70eV), comparándolos con los de patrones y de las bases de datos (Wiley138, NIST02 y ADAMS) junto con los índices de retención de Kovats [7].

**2.3 Ensayo de actividad antioxidante (AO).** Se determinó la actividad AO de los AEs utilizando el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS<sup>•+</sup>, descrito por Re *et al* [8], mediante espectroscopía VIS a 734 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizaron Trolox<sup>®</sup>,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), BHT y BHA como compuestos de referencia. Para estas sustancias se determinó la actividad antioxidante total (*Total Antioxidant Activity*) – TAA (mmol de Trolox/kg sustancia evaluada).

## 3. RESULTADOS

**3.1 Composición química.** En la Tabla 1 se registran los nombres común, científico, lugar de procedencia, código asignado y los compuestos mayoritarios identificados en los extractos y aceites esenciales de las especies vegetales estudiadas.

Entre los componentes más abundantes identificados en los extractos obtenidos por SDE de las 6 especies reportadas en la Tabla 1, se encontraron el carvacrol, timol, mentona, pulegona y terpinen-4-ol. Las cantidades relativas para estos compuestos se hallaron entre 25-62%.

Los siguientes componentes fueron más abundantes en los extractos obtenidos por SDE, de las especies de *Origanum*, *Lippia* y *Thymus* bajo estudio: flores de Orégano cimarrón (*Lippia origanoides*): carvacrol (42,5%), *p*-cimeno (9,8%),  $\gamma$ -terpineno (8,9%), timol (6,7%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (4,0%); hojas de Orégano cimarrón, *Lippia origanoides*: carvacrol + timol (53,2%),

*p*-cimeno (10,1%),  $\gamma$ -terpineno (8,2%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (3,4%); hojas de Orégano común, *Origanum vulgare*: carvacrol (62,0%),  $\gamma$ -terpineno (9,5%), *p*-cimeno (7,5%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (4,7%); hojas de Mejorana, *Origanum majorana*: terpinen-4-ol (25,9%),  $\gamma$ -terpineno (11,6%), linalol + *cis*-4-tujanol (10,3%),  $\alpha$ -terpineno (8,1%),  $\alpha$ -terpineol + *cis*-piperitol (6,0%) y sabineno (5,8%); hojas de Tomillo, *Thymus vulgare*: timol (35,8%), *p*-cimeno (19,5%),  $\gamma$ -terpineno (9,7%) y acetato de bornilo – carvacrol (4,3%); hojas de Orégano de Castilla, *Lippia micromera*: timol + 3-metil-4-isopropilfenol (29,4%), metil-timil-éter (14,3%),  $\gamma$ -terpineno (14,3%), *p*-cimeno (8,4%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (4,1%) y  $\alpha$ -terpineno (4,0%); hojas de Orégano de Castilla, *Lippia micromera* (complejo CENIVAM): timol (34,1%), metil-timil-éter (13,8%),  $\gamma$ -terpineno (9,6%),  $\beta$ -felandreno + eucaliptol (6,6%) y *p*-cimeno (6,3%); y hojas de Orégano rastrero: mentona (36,0%), pulegona (33,5%), timol + *trans*-anetol + carvacrol (6,9%) e *iso*-mentona (4,1%).

De acuerdo con lo reportado en la Tabla 1, la mayoría de las especies estudiadas presentaron timol y carvacrol como componentes mayoritarios. No obstante, se determinó que la Mejorana y el “Orégano rastrero” fueron ricos en terpinen-4-ol y en mentona y pulegona, respectivamente. Con base en estos resultados se seleccionaron 4 especies para aislar sus aceites esenciales.

Los rendimientos obtenidos por MWHD fueron: Orégano común - 0,1%; Orégano cimarrón (*Lippia origanoides*) - 2,3%; Tomillo - 0,2%; y Orégano de Castilla - 1,6%.

Los componentes mayoritarios identificados en los AEs de las especies de *Origanum*, *Lippia* y *Thymus* bajo estudio fueron: Orégano común: carvacrol (53,7%),  $\gamma$ -terpineno (10,6%), *p*-cimeno (8,6%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (6,6%) y *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (3,7%); Orégano cimarrón: carvacrol (44,4%), timol (14,3%),  $\gamma$ -terpineno (10,0%) y *p*-cimeno (9,5%); Tomillo: timol (34,0%), *p*-cimeno (17,7%),  $\gamma$ -terpineno (6,8%) y acetato de bornilo + carvacrol (5,7%); y Orégano de Castilla: timol + 3-metil-4-isopropilfenol (24,7%), *p*-cimeno (19,2%), metil-timil-éter (16,5%),  $\gamma$ -terpineno (4,8%), carvacrol (3,5%), limoneno +  $\beta$ -felandreno + eucaliptol (3,4%) y *trans*- $\beta$ -cariofileno (4,5%).

Según la composición dada para los AEs de las especies se encontró que Orégano común presentó el más alto contenido de carvacrol (~54%); mientras que, el Tomillo presentó el mayor contenido de timol (34%).

### 3.2 Ensayos de actividad antioxidante

La actividad de atrapamiento de radicales fue evaluada utilizando vitamina E, BHA y BHT en diferentes concentraciones. La respuesta-concentración de las sustancias, como porcentaje de la absorbancia del catión-radical ABTS<sup>+</sup> sin inhibir fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación: **Inhibición de A<sub>734</sub> (%) = (1 - A<sub>f</sub>/A<sub>o</sub>) x 100**; donde A<sub>o</sub> es la absorbancia del catión-

radical sin inhibir y A<sub>f</sub> es la absorbancia medida a los 6 min después de la adición del antioxidante. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos, para las sustancias de referencia y de interés, en términos de TAA (mmol de Trolox/kg de sustancias evaluada).

Planta		Código (parte usada)	Lugar de procedencia	Compuestos mayoritarios, cantidad relativa (%)					
Nombre común	Nombre científico			Sustancias	I <sub>R-DB5</sub>	SDE	MWHD		
Orégano común	<i>Origanum vulgare</i>	OC (hojas)	Cultivo experimental CENIVAM	Carvacrol	1317	62,0	53,7		
				$\gamma$ -Terpineno	1068	9,5	10,6		
				<i>p</i> -Cimeno	1035	7,5	8,6		
				<i>trans</i> - $\beta$ -Cariofileno	1440	4,7	6,6		
Orégano cimarrón	<i>Lippia origanoides</i>	LOF (flores)	Cultivo experimental CENIVAM	Carvacrol	1317	42,5			
				<i>p</i> -Cimeno	1035	9,8			
				$\gamma$ -Terpineno	1068	8,9			
				Timol	1298	6,7			
		LOH (hojas)	Cultivo experimental CENIVAM		Carvacrol	1315	---	44,4	
					Timol	1294	---	14,3	
					Carvacrol + Timol	1318	53,2	---	
					$\gamma$ -Terpineno	1068	8,2	10,0	
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	TOM (hojas)	Cultivo experimental CENIVAM	<i>p</i> -Cimeno	1035	10,1	9,5		
				Timol	1298	35,8	34,0		
				$\gamma$ -Terpineno	1068	9,7	6,8		
				Carvacrol	1315	4,3	5,7		
Orégano de Castilla	<i>Lippia micromera</i>	ODC (hojas)	Mercado local	Timol	1298	29,4	24,7		
				<i>p</i> -Cimeno	1035	8,4	19,2		
				Metil-timil-éter	1236	14,3	16,5		
				$\gamma$ -Terpineno	1068	14,3	4,8		
			LM (hojas)	Cultivo experimental CENIVAM		Carvacrol	1315	---	3,5
						Timol	1298	34,1	
						Metil-timil-éter	1236	13,8	
						$\gamma$ -Terpineno	1068	9,6	
Orégano rastrero		OR (hojas)	Mercado local	Eucaliptol	1036	6,6			
				<i>p</i> -Cimeno	1035	6,3			
				Mentona	1171	36,0			
				Pulegona	1254	33,5			
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	MEJ (hojas)	Cultivo experimental CENIVAM	Timol + <i>trans</i> -Anetol + Carvacrol	1293	6,9			
				<i>iso</i> -Mentona	1177	4,1			
				Terpinen-4-ol	1189	25,9			
				$\gamma$ -Terpineno	1068	11,6			
				Linalol + <i>cis</i> -4-Tujanol	1102	10,3			
Orégano común				$\alpha$ -Terpineno	1023	8,1			
				<i>cis</i> -Piperitol	1189	6,0			
				Sabineno	979	5,8			

Tabla 1. Composición química, lugar de procedencia, código de identificación, nombres científico y común de las 6 especies vegetales estudiadas.

Sustancia	TAA (mmol Trolox/ kg SE)
	Promedio $\pm$ s
$\alpha$ -Tocoferol	2590 $\pm$ 33
BHT	990 $\pm$ 31
BHA	6900 $\pm$ 487
Orégano cimarrón	2040 $\pm$ 21
Orégano de Castilla	670 $\pm$ 24
Tomillo	890 $\pm$ 32
Orégano común	800 $\pm$ 24

Tabla 2. Valores de TAA para las sustancias de referencia y AEs con alto contenido de timol y carvacrol empleando el ensayo de decoloración con ABTS<sup>+</sup>.

Los AEs evaluados presentaron menor capacidad antioxidante que las sustancias de referencia, BHA y  $\alpha$ -Tocoferol. Sin embargo, tres de ellos (Orégano común, Tomillo y Orégano de castilla) exhibieron capacidad antiradicalaria cercana al antioxidante BHT y uno (Orégano cimarrón) presentó mayor actividad que el BHT.

Al comparar los cuatro AEs se encontró que sus actividades antioxidantes decrecen así: AE Orégano cimarrón >> AE Tomillo > AE Orégano común > AE Orégano de Castilla (Figura 1). La capacidad antiradicalaria del AE de Orégano cimarrón fue 2,4 veces mayor que la capacidad del AE de Tomillo. La capacidad para atrapar el catión-radical ABTS<sup>+</sup> por los AEs de Orégano de Castilla y Orégano cimarrón, determinadas por este método, se reportan por primera vez.

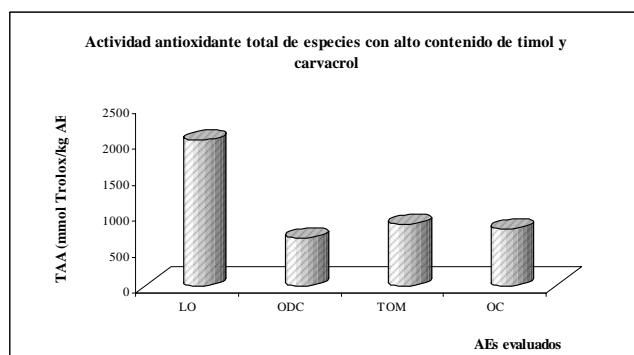


FIGURA 1. Actividad antioxidante total de las especies con alto contenido de timol y carvacrol. LO: Orégano cimarrón; ODC: Orégano de Castilla; TOM: Tomillo y OC: Orégano común.

#### 4. CONCLUSIONES

Dentro de los componentes identificados en los extractos SDE de la Mejorana (*Origanum majorana*) se encontró el timol a nivel de trazas, el compuesto mayoritario fue terpinen-4-ol. El Orégano rastrero presentó timol y carvacrol como componentes minoritarios (~7%). Los componentes más abundantes para esta especie fueron mentona y pulegona. El componente más abundante identificado en el AE de Orégano común fue el carvacrol (~54%) siendo éste una fuente autóctona potencial de este compuesto.

Los ensayos de actividad AO mostraron que los AEs evaluados presentaron una menor actividad comparada con los antioxidantes BHA y  $\alpha$ -tocoferol. Sin embargo, Tomillo, Orégano de Castilla y Orégano común presentaron capacidad antiradicalaria cercanas a la del antioxidante sintético BHT; mientras que, la actividad antiradicalaria del Orégano cimarrón fue mayor que la del BHT. Con los datos obtenidos de actividad se confirma que los AEs son potentes antioxidantes naturales, los cuales pueden ser usados en alimentos como posibles sustitutos de los antioxidantes sintéticos, pudiendo atrapar radicales libres y prevenir la oxidación.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero obtenido a través de Colciencias -CENIVAM (Contrato RC-432-2004).

#### 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; *et al.* Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey, *Food Control*, 2004, 15, pp. 169–172.
- [2] LAHLOU, M., Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils, *Phytother. Res.*, 2004, 18, pp. 435-436.
- [3] BURDOCK, George A. Fenaroli's handbook of flavor ingredients. 5th edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2005, pp. 262, 1789-1794.
- [4] GOREN, A.; BILSEL, G.; BILSEL, M.; *et al.* Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Z. Naturforsch.*, 2003, 58c, pp. 687-690.
- [5] VERNIN, G.; LAGEOT, C.; GAYDOU, E.; *et al.* Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador, *Flav. Fragr. J.* 2001; 16, pp. 219–226.
- [6] ZHENG, W.; WANG, S.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, pp. 5165-5170.
- [7] ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2004, 456 p.
- [8] RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay., *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, 26, pp. 1231-1237.