

## ESTUDIO COMPARATIVO SOBRE LA CAPACIDAD DE ATRAPAMIENTO DEL CATION-RADICAL ABTS<sup>+</sup> POR LOS ACEITES ESENCIALES DE ESPECIES AROMÁTICAS CON ALTO CONTENIDO DE *trans*-ANETOL Y ESTRAGOL

### RESUMEN

Se determinó la composición química de aceites esenciales (AEs) y extractos de seis especies aromáticas con alto contenido de *trans*-anetol y estragol (estragón de invierno, estragón, anís estrellado, anisillo, hinojo y sígueme morado), obtenidos por hidrodestilación asistida por radiación de microondas (MWHD) y destilación-extracción simultánea con solvente (SDE). La separación e identificación de los compuestos se realizó por GC-MS en columna apolar DB-5MS, comparando sus espectros de masas con los de las bases de datos ADAMS, NIST02 y Wiley138 e índices de retención de Kováts. Para todos los AEs se evaluó su capacidad del atrapamiento del catión-radical ABTS<sup>+</sup> (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-bencenosulfónico-6)).

**PALABRAS CLAVES:** Estragol, *trans*-anetol, aceites esenciales, ABTS<sup>+</sup>, MWHD, SDE.

### ABSTRACT

*Essential oils and extracts of six species with high content of trans-anethole and estragole (tarragon, french tarragon, star anise, "anisillo", fennel and Ocimum spp.) were obtained by microwave-assisted hydrodistillation (MWHD) and simultaneous distillation-solvent extraction (SDE). Compound separation and identification were performed by GC-MS (EI, 70 eV), using Kováts indices and comparisons with MS from different libraries (Adams, NIST02 and Wiley138). The antioxidant activity of essential oils was evaluated as their radical scavenging capacity using the ABTS<sup>+</sup> (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical-cation decolorization assay.*

**KEYWORDS:** *Estragole, trans-anethole, essential oils, ABTS<sup>+</sup>, MWHD, SDE.*

AMNER MUÑOZ\*

Químico, M.Sc.; Estudiante de Doctorado

EDWIN J. BOTTIA\*

Estudiante de Química

CAROL Y. CARDENAS\*

Estudiante de Química

JOSE G. PATIÑO\*

Estudiante de Química

OLGA L. DÍAZ\*

Estudiante de Química

JAIRO R. MARTÍNEZ\*

Químico, Ph.D.

Profesor titular Escuela de Química

VLADIMIR V. KOUZNETSOV\*\*

Químico, Ph.D.

Profesor titular Escuela de Química

ELENA E. STASHENKO\*

Química, Ph.D.

Profesor titular Escuela de Química

\*Laboratorio de Cromatografía,

\*\*Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Centro de Investigación en Biomoléculas – CIBIMOL y Centro de Investigación CENIVAM, Universidad Industrial de Santander  
elena@tucan.uis.edu.co

## 1. INTRODUCCIÓN

*trans*-Anetol y estragol son compuestos ampliamente utilizados como saborizantes y aromatizantes en las industrias de alimentos y bebidas alcohólicas; además, son utilizados en perfumes, jabones y detergentes y como precursores en síntesis orgánica para formulaciones farmacéuticas. Estos compuestos presentan varias actividades biológicas como insecticida, bactericida, antiinflamatoria y anestésica y se han encontrado en una variedad de especies aromáticas que incluyen el tarragón, albahaca, hinojo, anís y anís estrellado [1,2]. El estragol fue reconocido como sustancia segura (GRAS) y aprobado para uso en alimentos. Sin embargo, él y sus metabolitos han mostrado ser genotóxicos y producir tumores hepáticos en experimentos con animales, debido a esto, su empleo está limitado [2,3].

Las especies vegetales aromáticas han sido utilizadas en muchas áreas de medicina, nutrición, como saborizantes, en bebidas, como repelentes, en fragancias y cosméticos y con otros propósitos industriales, entre los cuales se aprovecha sus efectos preservantes [4-6]. Estas propiedades o efectos sugieren la presencia de constituyentes antimicrobiales y antioxidantes en sus tejidos. Actualmente, el interés de encontrar antioxidantes provenientes de fuentes naturales se ha incrementado considerablemente, tanto para uso en alimentos o en fármacos medicinales, como para reemplazar antioxidantes sintéticos, los cuales están cada vez más restringidos por sus posibles efectos cancerígenos [7].

El propósito de este trabajo fue determinar la posible actividad antioxidante, medida como su capacidad de atrapar radicales, de especies con alto contenido de *trans*-

anetol y estragol (estragón de invierno, flores y hojas, anís estrellado, anisillo, hinojo, sígueme morado y estragón francés), y compararla con aditivos comunes para alimentos (BHT, BHA y  $\alpha$ -tocoferol), para posible uso como antioxidantes naturales.

## 2. METODOLOGÍA

**2.1 EXTRACTOS Y AEs.** Los extractos y aceites esenciales de las 6 especies fueron obtenidos empleando las técnicas SDE (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y MWHd.

**2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA.** La composición química de los AEs y los extractos se determinó mediante su análisis por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS), utilizando la columna analítica DB-5, como sistema de separación. Los espectros de masas de los compuestos aislados se compararon con los de las bases de datos Wiley138, NIST02 y ADAMS, usando

también los índices de retención de Kovats y sustancias patrón [8].

**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.* [9], mediante espectroscopía VIS a 734 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizaron Trolox<sup>®</sup>, BHT, BHA y  $\alpha$ -tocoferol, como compuestos de referencia. Para estas sustancias se determinó la actividad antioxidante total - TAA (mmol de Trolox/kg sustancia evaluada).

## 3. RESULTADOS

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

Planta		Código (parte usada)	Lugar de procedencia	Rendimiento del aceite (%p/p)	Compuestos mayoritarios, cantidad relativa (%)			
Nombre común	Nombre científico				Sustancia	I <sub>R-DB5</sub>	SDE	MWHd
Estragón de invierno	<i>Tagetes lucida</i>	EIF (flores)	Cultivo experimental, CENIVAM	0,5	Estragol	1222	87,5	93,2
		EIFH (hojas)	Cultivo experimental, CENIVAM	0,9	$\beta$ -Mirceno	991	4,8	2,5
Estragón francés	<i>Artemisia dracunculus</i>	EF (hojas)	Cultivo experimental, CENIVAM	0,5	Estragol	1222	89,0	93,8
					$\beta$ -Mirceno	991	4,6	3,4
					Metil-eugenol	1402	45,1	14,2
					Sabineno	976	20,9	15,3
					<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1051	7,3	3,6
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	1037	---	3,1					
Elimicina	1557	---	33,3					
<i>cis</i> -Asarona	1653	---	14,7					
Anís estrellado	<i>Illicium verum</i>	AS (frutos)	Mercado local	2,0	<i>trans</i> -Anetol	1307	73,0	82,5
					Limoneno	1035	5,1	3,0
					Estragol	1222	3,5	4,1
Anisillo		ANUIS (hojas)	Cultivo experimental, CENIVAM	1,6	<i>trans</i> -Anetol	1307	70,5	70,6
					Estragol	1222	27,0	27,4
Anisillo		ANB (hojas)	Cultivo Bolivar, Santander	0,4	<i>trans</i> -Anetol	1307	---	73,0
					Estragol	1222	---	23,6
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare</i>	HIN (hojas)	Mercado local	0,3	<i>trans</i> -Anetol	1307	72,0	73,3
					Limoneno	1035	11,0	9,0
					Estragol	1222	5,6	5,8
					$\alpha$ -Pinenol	934	4,1	3,5
Sígueme morado	<i>Ocimum spp.</i>	SM (hojas)	Cultivo experimental, CENIVAM	0,2	Estragol	1222	49,5	49,9
					Linalol	1109	13,1	11,3
					Eucaliptol	1041	7,7	6,7

Tabla 1. Composición química determinada por GC-MS (SDE y MWHd), lugar de procedencia, código de identificación, rendimiento de AE, nombres científico y común de las 6 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 estragol, *trans*-anetol, metil-eugenol y sabineno. Las cantidades relativas para estos compuestos se encontraron en el rango de 21-89%.

Los componentes más abundantes identificados en todos los extractos obtenidos por SDE de las especies de *Tagetes*, *Artemisia*, *Foeniculum* e *Illicium* bajo estudio fueron: Hinojo: *trans*-anetol (72,0%), limoneno (11,0%), estragol (5,6%) y  $\alpha$ -pineno (4,1%); anisillo: *trans*-anetol (70,5%) y estragol (27,0%); anís estrellado: *trans*-anetol (73,0%), limoneno (5,1%) y estragol (3,5%); flores de estragón de invierno: estragol (87,5) y  $\beta$ -mirceno (4,8%); hojas de estragón de invierno: estragol (89,0) y  $\beta$ -mirceno (4,6%) y hojas de estragón francés: metil-eugenol (45,1%), sabineno (20,9%), *trans*- $\beta$ -ocimeno (7,3%) y terpinen-4-ol (3,6%).

La mayoría de las especies estudiadas presentaron alto contenido de estragol y *trans*-anetol. Se encontró que en la especie de “anisillo” (cultivado en la parcela experimental de la UIS) estuvo presente los dos componentes, estragol y *trans*-anetol, en cantidades relativamente altas (27 y 70%, respectivamente). En las demás especies siempre predominó uno de estos compuestos. La composición química de las flores y hojas de estragón francés (*Tagetes lucida*) fue muy similar, prevaleciendo el estragol con cantidades relativas de 88 y 89%, respectivamente. Sin embargo, se encontró que la especie *Artemisia dracunculoides* (estragón francés) no presentó el estragol como componente más abundante (cantidad relativa ~1%), sino el metil-eugenol (45%). No obstante, se procedió a obtener los AEs de todas las especies anteriormente mencionadas, incluyendo el estragón francés, flores de estragón de invierno y anisillo, proveniente de Bolívar, Santander.

Los componentes mayoritarios identificados en los AEs obtenidos por MWD (ver Tabla 1) de las especies de *Ocimum*, *Tagetes*, *Foeniculum*, *Artemisia* e *Illicium* bajo estudio fueron: Sígueme morado: estragol (49,9%), linalol (11,3%), eucaliptol (6,7%) y  $\tau$ -cadinol (3,1%); hinojo: *trans*-anetol (73,3%), limoneno (9,0%), estragol (5,8%) y  $\alpha$ -pineno (3,5%); anisillo, de Bolívar: *trans*-anetol (73,0%) y estragol (23,6%); anisillo, de complejo CENIVAM-UIS: *trans*-anetol (70,6%) y estragol (27,4%); anís estrellado (AS): *trans*-anetol (82,5%),  $\alpha$ -terpineol- $\gamma$ -terpineol (4,1%) y limoneno (3,0%); estragón francés: elimicina (33,3%), sabineno (15,3%), *cis*-asarona (14,7%), metil-eugenol (14,2%), *trans*- $\beta$ -ocimeno (3,6%) y *cis*- $\beta$ -ocimeno (3,1%); flores de estragón de invierno: estragol (93,2%) y  $\beta$ -mirceno (2,5%) y hojas de estragón de invierno: estragol (93,8%) y  $\beta$ -mirceno (3,4%).

Con base en la composición dada para los AEs de las especies se encontró que las flores de *Tagetes lucida* fueron una fuente de estragol (93%); la composición química de las dos especies de “anisillo”, cultivadas en Bolívar y en UIS, presentó pequeñas diferencias, posiblemente, a factores ambientales y geográficos; el anís estrellado, fue fuente de *trans*-anetol; y, las composiciones químicas del AE y del extracto SDE de estragón francés fueron diferentes. En el AE de esta planta se identificaron dos componentes adicionales: elimicina y *cis*-asarona.

### 3.3 ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para validar el ensayo de la actividad AO se utilizaron diferentes concentraciones de Trolox, vitamina E, BHA y BHT. La respuesta-dosis de la sustancia de referencia, 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>0</sub>) x 100**; donde A<sub>0</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 de la muestra antioxidante. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos, para las sustancias de referencia y de interés, en términos de la actividad antioxidante total (TAA).

Sustancia/AEs	TAA (mmol Trolox/ kg SE)
	Promedio $\pm$ s
$\alpha$ -Tocoferol	2590 $\pm$ 33
BHT	990 $\pm$ 31
BHA	6900 $\pm$ 487
Anís estrellado	5,6 $\pm$ 0,1
Estragón de invierno: flores	3,68 $\pm$ 0,06
Estragón de invierno: hojas	3,8 $\pm$ 0,2
Anisillo, cultivo UIS	2,6 $\pm$ 0,2
Anisillo, cultivo Bolívar	1,5 $\pm$ 0,1
Sígueme morado	5,1 $\pm$ 0,2
Hinojo	0,00015 $\pm$ 0,00001
Estragón francés	0,00023 $\pm$ 0,00001

Tabla 2. Valores de TAA para AEs estudiados y sustancias de referencia usando el catión-radical ABTS<sup>+</sup>.

La capacidad antiradicalaria de los AEs, en comparación con los antioxidantes BHA, BHT y la vitamina E fue relativamente baja, lo que puede ser atribuido a la ausencia de fenoles o sustancias capaces de donar hidrógeno. Los AEs de anís estrellado y sígueme morado exhibieron los valores más altos de TAA, seguidos por los AEs de las flores y hojas de *Tagetes lucida*, con valores de inhibición muy cercanos; mientras que, los aceites de hinojo y estragón francés presentaron la actividad antiradicalaria más baja, siendo un poco más activos los aceites esenciales de “anisillo” cultivados en

Bolívar (Santander) y complejo CENIVAM-UIS (Figura 1).

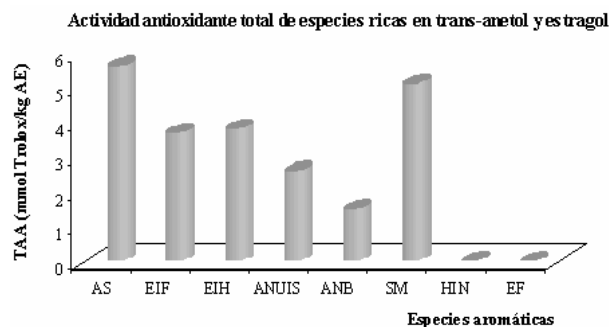


Figura 1. Comparación de las actividades antioxidantes totales (TAA) de los AEs de 6 especies estudiadas. AS: Anís estrellado; EIF: Estragón de invierno, flores; EIH: Estragón de invierno, hojas; ANUIS: Anisillo, cultivo UIS; ANB: Anisillo, cultivo Bolívar (Santander); SM: Sígueme morado; HIN: Hinojo y EF: Estragón francés.

#### 4. CONCLUSIONES

Los AEs de las flores de *Tagetes lucida* y anisillo fueron una fuente de estragol (93%) y *trans*-anetol (70%), respectivamente. Ambos aceites presentaron rendimientos aceptables (0,5 y 1,6 ó 0,5% (dependiendo del lugar de procedencia)). El AE de *Artemisia dracunculoides* presentó como componentes mayoritarios la elemicina, asarona y metil-eugenol.

Los ensayos de actividad AO mostraron que los AEs evaluados presentaron una actividad relativamente baja comparada con los compuestos de referencia. Sin embargo, algunos de ellos podrían ser utilizados como potenciales antioxidantes naturales en la industria de alimentos. Además, se observó como influye la composición química en la capacidad antiradicalaria.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

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

#### 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FREIRE, R.S.; MORAIS, S.M.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.; *et al.* Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, pp. 4353–4358.

[2] RIETJENS, I.M.C.M.; BOERSMA, M.G.; VAN DER WOUDE, H; *et al.* Review: Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutat. Res.*, 2005, 574, pp. 124–138

[3] DE VINCENZI, M.; SILANO, M.; MAIALETTI, F.; *et al.* Safety data review - Constituents of aromatic plants: II. Estragole. *Fitoterapia*, 2000, 71, pp.725-729.

[4] DJERIDANE, A.; YOUSFI, M; NADJEMI, B.; *et al.* Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 2006, 97, pp. 654–660.

[5] MURCIA, M.A.; EGEE, I; ROMOJARO, F.; *et al.* Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, pp. 1872-1881.

[6] CRAIG, W.J. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, 70, pp.491S–499S.

[7] VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L; *et al.* Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, pp. 4113-4117.

[8] ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by GC/MS (quadrupole). Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 2004, 456 p.

[9] 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.