



## Determinación de la actividad antioxidante en ingredientes herbales para alimentos utilizando nuevos métodos de análisis químico

## Determination of antioxidant activity in herbal ingredients for foods using new methods of chemical analysis

Katalina Muñoz; Natalie Cortés; Andrea Pujol\*; Edison Osorio; Jeniffer Calderón; Julián Londoño

Universidad de Antioquia, Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, Calle 62 # 52 - 59 Torre II Lab 229, Medellín, Colombia.

Recibido 05 diciembre 2011; aceptado 27 junio 2012

### Resumen

Un nuevo procedimiento ha sido utilizado para la separación y cuantificación de la actividad captadora de radicales libres de cada uno de los compuestos de 18 muestras de *Thymus Vulgaris* y 12 muestras de *Rosmarinus Officinalis* (ambos usados en alimentos como conservantes naturales), basado en la combinación de HPTLC (cromatografía en capa fina de alto rendimiento) y derivatización postcromatográfica con el radical DPPH\*. Los compuestos timol y ácido rosmarínico en *T. vulgaris* y *R. officinalis* respectivamente, fueron identificados por comparación de sus valores Rf y espectro UV de estándares analizados bajo iguales condiciones analíticas, mientras que los datos cuantitativos fueron calculados a partir de sus curvas de calibración. Hemos encontrado que no solo la producción de biomasa, sino también el contenido de metabolitos en las plantas, dependen del ecotipo (genética) y de las condiciones agroecológicas. El efecto del ambiente sobre el contenido de metabolitos y su actividad antioxidante es extremadamente significativo (ANOVA, Newman-Keuls Multiple Comparison post test was performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software).

**Palabras clave:** HPTLC, DPPH, Antioxidantes, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*.

### Abstract

A new procedure has been used to separate and quantify the free radical-scavenging activity of individual compounds 18 samples of *Thymus vulgaris* and 12 samples of *Rosmarinus officinalis* (both used as natural food preservatives), based on the combination of HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) and postchromatographic DPPH\* radical derivatization. The compounds thymol and rosmarinic acid in *T. vulgaris* and *R. officinalis*, respectively, were identified by comparisons of their Rf values and UV spectra to standards analyzed under identical analytical conditions, while the quantitative data were calculated from their calibration curves. We found that not only that the biomass yield but also the metabolite content in herbs, depend on the ecotype (genetics) and on the agro ecological conditions. The effect of the ambient on the metabolite content is extremely significant and also on their antioxidant activity (One-way ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison post test was performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software). This work pretends to demonstrate the great importance of using new technologies for the selection of the best materials used as natural food preservatives.

**Keywords:** HPTLC, DPPH, Antioxidants, *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*.

### 1. Introducción

Los antioxidantes juegan un papel importante en la reducción del proceso oxidativo tanto en el cuerpo humano como en los alimentos. En estos últimos, los antioxidantes son usados para retardar la

peroxidación lipídica y los subproductos secundarios de esta, por lo tanto ayudan a mantener el sabor, la textura y en algunos casos el color de los alimentos durante el almacenamiento. Además, los antioxidantes reducen la oxidación de las

\* Autor para correspondencia

Email: andreapujol4@hotmail.com (A. Pujol)

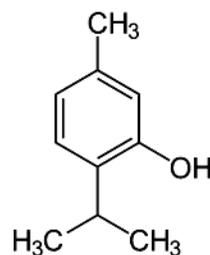
proteínas así como la interacción de lípidos derivados de carbonilos con proteínas que conducen a una alteración de la funcionalidad de las proteínas (Elias *et al.*, 2008; Samaranyaka y Li-Chan, 2011). Antioxidantes naturales como son la vitamina C, tocoferoles, extractos de té así como extractos de productos naturales como romero, han sido comercializados como una alternativa a los antioxidantes sintéticos en sistemas alimentarios (Shahidi, 2000).

*Thymus vulgaris* (*T. vulgaris*) y *Rosmarinus Officinalis* (*R. officinalis*), así como muchas otras plantas aromáticas biosintetizan alta cantidad de compuesto volátiles como el aceite esencial. En *T. vulgaris*, se encuentran entre los compuestos más importantes disponibles en el aceite, timol y carvacrol los cuales han reportado la mayor actividad antioxidante (Sarikurku *et al.*, 2010). Además, estos compuestos presentan otras actividades biológicas. El timol es un antiséptico, mientras que el carvacrol posee propiedades antifúngicas (Menphini *et al.*, 1993). Por lo tanto, toda la planta de tomillo, sus aceites esenciales y compuestos no volátiles se pueden utilizar como conservantes naturales e ingredientes antioxidantes en las industrias alimentarias (Nguefack *et al.*, 2009). Por su parte *Rosmarinus officinalis* (*R. officinalis*) es probablemente una de las especies más explotadas por su aceite esencial, fenoles y propiedades biológicas como conservante de alimentos (Zaouali *et al.*, 2010).

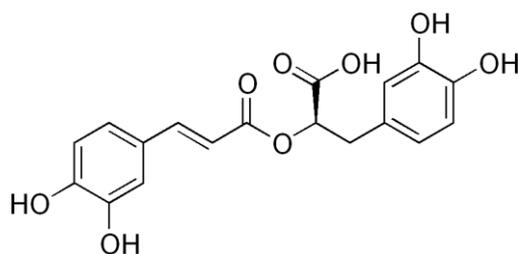
La cantidad y calidad de los antioxidantes, llamados polifenoles, en alimentos de origen vegetal puede variar significativamente de acuerdo a factores intrínsecos y extrínsecos como es el genotipo de la planta, la composición del suelo y las condiciones de crecimiento, estado de madures y las condiciones poscosecha, entre otros (Jaffery *et al.*, 2003). Pero, aunque los polifenoles tienen una alta demanda así como sus fuentes, hay un gran problema para asegurar la calidad del material crudo debido a la variabilidad del

contenido de metabolitos. Este trabajo usa HPTLC (Cromatografía en capa fina de alta eficiencia) para comparar la calidad en términos del contenido de metabolitos y capacidad antioxidante. El radical 1,1-difenil - 2 - picrilhidrazil (DPPH) es un radical libre muy popular usado en la evaluación de la actividad antioxidante. Con una separación cromatográfica, una consecuente determinación de actividad antirradicalaria se puede evaluar la contribución antioxidante de los diferentes componentes en el extracto.

Un nuevo procedimiento ha sido utilizado para separar y cuantificar la actividad captadora de radicales libres de cada uno de los compuestos de 18 muestras de *Thymus vulgaris* y 12 muestras de *Rosmarinus officinalis* (ambos utilizados como conservantes naturales de alimentos), basado en la combinación de HPTLC y derivatización poscromatográfica con el radical DPPH<sup>•</sup>. Este trabajo pretende demostrar la gran importancia del uso de nuevas metodologías para la selección de materiales usados como conservantes naturales de alimentos.



**Figura 1.** Estructura molecular del timol.



**Figura 2.** Estructura molecular del ácido rosmarínico.

## 2. Materiales y métodos

**Material vegetal:** la recepción de las partes aéreas de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* fue coordinada por el personal encargado de hacer su recolección con el fin de evitar el deterioro de este por almacenamiento inadecuado. El material se codificó y se llevó a secado controlado en una estufa de convección de aire caliente a 45°C. El material seco se pulverizó con la ayuda de un molino eléctrico, se etiquetó y selló al vacío hasta el momento del análisis. Para *T. vulgaris* se evaluaron 3 orígenes diferentes: T1, T2 y T3, los cuales fueron recolectados en 6 regiones agroecológicas de Antioquia (Colombia). Rio Negro (RN), La Ceja (LC), Marinilla (M), Peñol (P), Guarne (G) y Santuario (S), se evaluó la influencia de los tiempos de recolección en el origen 2: 4 meses (T2\_4), 6 meses (T2\_6) y 9 meses (T\_9) y por último se evaluó la influencia de diferentes métodos de secado para el origen 3: Secado en laboratorio (T3\_Sec.) y secado un día en marquesina y horno (T3\_dia). Para *R. officinalis* solo se evaluaron 2 orígenes R1 y R2, los cuales fueron cultivados y recolectados en las mismas regiones que para *T. vulgaris*, se evaluó también la influencia de diferentes tipos de secado para el origen 1: Secado en laboratorio (R1\_secado Lab.), presecado (R1\_presecado), secado en marquesina (R1\_secado marq.).

**Estándares y reactivos:** Tolueno, acetato de etilo, diclorometano, tolueno (grado HPLC marca Merck (Darmstadt, Alemania)), DPPH• (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU), timol y ácido rosmarínico grado primario (Chromadex), metanol, ácido fórmico, formiato de etilo (grado reactivo, marca Merck).

**Análisis en HPTLC:** se emplearon placas 20x10 de sílica gel 60 (Darmstadt, Alemania) soportados en aluminio. Las muestras fueron aplicadas sobre las placas con una jeringa de 100 µL (Hamilton, Bonaduz, suiza), en un volumen de 6µL en

bandas de 5mm de longitud. Las placas se desarrollaron en una cámara vertical (Camag, Suiza) pre acondicionada por 3 min, utilizando para *T. vulgaris* un sistema tolueno/acetato de etilo (93:7) y para *R. officinalis* tolueno/formiato de etilo/ácido fórmico (50:40:10). Luego del desarrollo, las placas se secaron en campana de extracción para su posterior análisis en el escáner, por irradiación UV con una longitud de onda de 280 nm. Cada muestra se evaluó por duplicado. Con el propósito de calibrar el método, se prepararon soluciones stock y se sembraron cantidades conocidas de estándar con el fin de construir la curva de calibración.

Las placas fueron sumergidas en una solución de DPPH• al 0.05% se incubaron en la oscuridad durante 1,5 min y luego se llevaron a un horno a 60°C durante 30s. El análisis en el escáner se realizó en modo fluorescencia a una longitud de onda de 518 nm a 10, 15 y 20 min, registrándose los valores de R<sub>f</sub> 0.52 para Timol y 0.75 para ácido rosmarínico. El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Gradpad prisma, versión 4 para Windows, con un nivel de confianza del 95%. La actividad antioxidante para cada componente de los extractos se estimó con la disminución de la intensidad del fondo violeta/morado de las placas y fue cuantificado como un poco negativo por escáner a 518 nm (Camag TLC scanner).

## 3. Resultados y discusión

La separación cromatográfica, la actividad *in situ* del barrido de radicales y el análisis cuantitativo de los metabolitos secundarios, obtenidos de los extractos de *T. vulgaris* y *R. officinalis* a partir de sus partes aéreas, fue llevado a cabo por los métodos en línea HPTLC-DAD y HPTLC-DPPH•. Gracias a la simultánea separación y la determinación con el escáner, fue posible analizar los extractos sin una preparación extensiva. Los compuestos timol y ácido rosmarínico fueron identificados por comparación de sus valores de R<sub>f</sub> y el espectro ultravioleta de

los estándares analizados bajo las mismas condiciones analíticas, mientras los datos cuantitativos fueron calculados de sus curvas de calibración.

En la Figura 1 se encuentran los resultados de la cantidad de timol en  $\mu\text{g}$  por mg de muestra de las diferentes procedencias y localidades de *T. vulgaris*, pero debido a que T2-RN, T1-RN, T1-LC y T3-secado marquesina tienen una concentración de timol superior al límite de la curva de la calibración, no fue posible su visualización en este gráfico. Además, las muestras T2-P, T3-P y T1-M, poseen una cantidad de este metabolito menor al límite inferior de la curva de calibración por lo que no se visualizan en la gráfica. En cambio, en el caso de *R. officinalis*, solo el 17% de las muestras se salen del rango de la curva de calibración (R2-6 y R2-P).

La actividad antioxidante es expresada como  $\mu\text{g}$  equivalente de ácido rosmarínico/mg, lo cual representa la cantidad en  $\mu\text{g}$  de cualquier compuesto o grupo de compuestos presente en 1 mg de muestra seca con la misma actividad antioxidante del ácido rosmarínico.

La curva de calibración de los picos negativos de ácido rosmarínico fue obtenida de una solución de calibración desarrollada en el HPTLC y una consecuente derivatización postcromatográfica con el radical DPPH $\bullet$ .

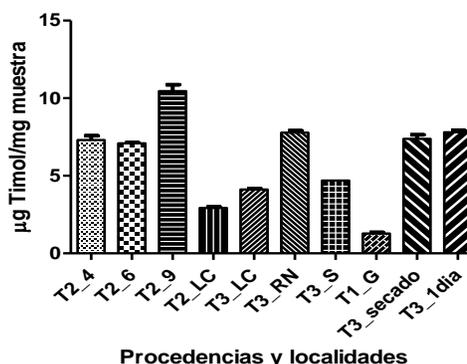
Una correlación lineal fue encontrada entre la cantidad del analito y el área del pico negativo ( $R^2=0.9805$ ). El método fue aplicado para medir la actividad captadora de radicales libres a través de timol en *T. vulgaris* y a través de ácido rosmarínico en *R. officinalis*.

La actividad antioxidante entre las 11 muestras de *T. vulgaris* que se encuentran dentro de la curva de calibración fue diferente; el mejor material para la expresión del metabolito responsable de la actividad antioxidante es T3 - secado marquesina y horno y T3 - secado laboratorio son las que presentan la mayor

actividad captadora de radicales libres, lo cual refleja que el control del secado de las muestras y la temperatura afectan la concentración del metabolito timol.

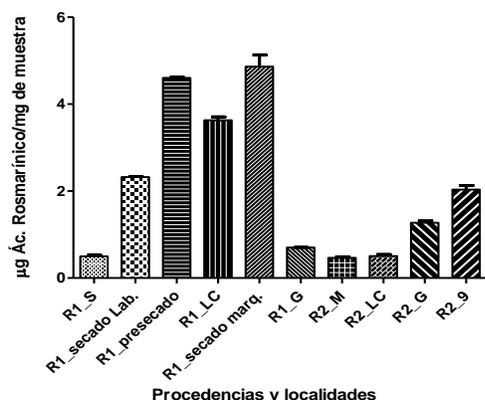
*R. officinalis* tuvo un comportamiento diferente, ya que en promedio la actividad antioxidante es superior a la de *T. vulgaris*. También en estas plantas se observa que el control del secado afecta significativamente la concentración del metabolito ácido rosmarínico, lo que tiene como resultado una actividad captadora de radicales mayor; esto se debe a la presencia de una mayor cantidad de grupos hidroxilo en su estructura molecular y de un mayor número de enlaces dobles conjugados, lo cual favorece la deslocalización del radical libre y por lo tanto su estabilización.

Este procedimiento podría ser usado para un análisis rápido en la industria farmacéutica y de alimentos, donde la estandarización del material seco juega un papel importante en la calidad y eficiencia del producto final. El extracto de las plantas tiene una estructura compleja y el aislamiento e identificación de los compuestos activos involucra dificultad, tiempo y procesos costosos. La derivatización postcromatográfica de placas en el método HPTLC-DPPH $\bullet$  usado en este estudio, puede ser satisfactoriamente usado para el análisis cualitativo y cuantitativo de actividad captadora de radicales libres en mezclas complejas.

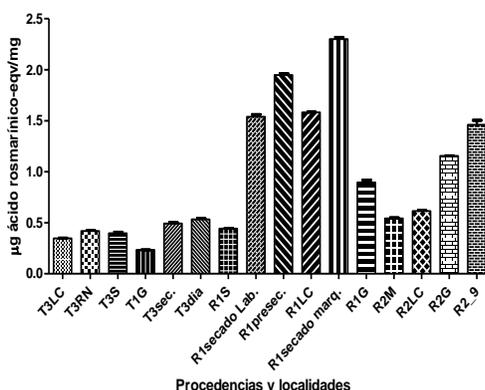


**Figura 1.**  $\mu\text{g}$  de timol por mg de muestra en las diferentes procedencias y localidades de *T. vulgaris*.

Este estudio ha establecido que algunos de los compuestos detectados de los extractos de *T. vulgaris* y *R. officinalis* fueron capaces de captar radicales DPPH•, así mismo la técnica de derivatización poscromatográfica puede ser usada como una alternativa económica, rápida y eficiente.



**Figura 2.** µg de ácido rosmarínico por mg de muestra de *R. officinalis*.



**Figura 3.** µg de ácido rosmarínico-equivalente/mg de muestra para *T. vulgaris* y *R. officinalis*.

#### 4. Conclusiones

En un trabajo anterior (Muñoz *et al.*, 2011) se ha observado que tanto el rendimiento de la biomasa como el contenido de metabolitos en las plantas dependen de factores genéticos y de las condiciones agroecológicas, debido al gran efecto del clima, humedad, temperatura, entre otras. De acuerdo a la actividad antioxidante de los materiales evaluados, se observó que el

efecto del ambiente y la forma de secado en el perfil antioxidante de las especies analizadas es extremadamente significativo. Este trabajo pretendió demostrar la gran importancia del uso de nuevas metodologías en el control de la calidad. Se implementó una metodología in situ para evaluar la actividad antioxidante de compuestos presentes en las plantas, lo cual podría ser una aplicación robusta, basada no solo en la composición química sino también en la actividad antioxidante.

#### Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia por la financiación de los proyectos 2007V7652-127 y 2007V7652-133 y a la Universidad Católica de Oriente, especialmente a Dagoberto Castro, Raquel Serna y Jaiber Díaz por el suministro de los materiales.

#### Referencias bibliográficas

- Elias, R. J.; Kellerby, S. S.; Decker, E. A. 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 48: 430–441.
- Jaffery, E.H.; Brown, A.F.; Kurilich, A.C.; Keek, A.S.; Matusheski, N.; Klein, B.P.; 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* 16: 323–330.
- Menphini, A.; Pagiotti, R.; Capuccella, M. 1993. Antifungal activity of carvacrol chemotypes of winter savory harvested in Italy. *Rivista Italiana EPPOS* 4: 566-571.
- Muñoz, K.; Calderón, J.; Osorio, E.; Castro, D.; Serna, R.; Díaz, J.; Londoño, J. 2011. Rapid HPTLC-based method for quality control: simultaneous chemical analysis and antioxidant activity determination in herbal, nutraceutical and functional foods. *Procedia Food Science*. 1: 960-964.
- Nguefack, J.; Dongmo, J.B.L.; Dakole, C.D.; Leth, V.; Vismer, H.F.; Torp, J.; et al. 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *Int J Food Microbiol* 131(2-3): 151-156.
- Samaranayaka, A.G.P., Li-Chan, E.C.Y. 2011. Food-derived peptidic antioxidants. A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*. 3: p 229-254.
- Sarikurku, C.; Sabih-Ozer, M.; Eskici, M.; Tepe, B.; Can, S.; Mete, E. 2010. Essential oil composition and antioxidant activity of *Thymus longicaulis* C. Presl subsp. *longicaulis* var. *longicaulis*. *Food Chem Toxicol* 48(7): 1801-1805.
- Shahidi, F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44: S158–S163.
- Zaouali, Y.; Bouzaine, T.; Boussaid, M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol* 48(11): 3144-3152.

