

ARTÍCULO ORIGINAL

Composición química volátil del aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante**Volatile chemical composition of essential oil from Colombian *Croton malambo* H. Karst. and determination of its antioxidant activity****Beatriz E. Jaramillo C,^I Edison Duarte,^{II} Karen Muñoz,^{III} Elena Stashenko^{IV}**

^IQuímica. Doctora en Química. Docente. Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.

^{II}Químico. Magíster en Química. Docente. Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.

^{III}Química Farmacéutica. Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia.

^{IV}Química. Doctora en Química. Docente. Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Centro de Excelencia CENIVAM, Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: el uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es un importante legado que han dejado generaciones anteriores y una parte de la cultura de los pueblos. Existen numerosos estudios sobre los aceites esenciales, en los cuales se destaca su gran utilidad en diversas áreas como productos cosméticos y perfumes, saborizantes, en la industria farmacéutica, etc. Varias investigaciones reportan las diferentes actividades biológicas que presentan los aceites esenciales (insecticidas, antioxidante, efecto antibacteriano y otros). *Croton malambo* H. Karst., pertenece a la familia Euphorbiaceae, es un árbol pequeño, de corteza aromática que crece en la costa norte colombiana y en la región oriental venezolana. Esta especie ha presentado actividad citotóxica, proapoptótica y actividad antiinflamatoria.

OBJETIVO: estudiar la composición química volátil del aceite esencial del C.

malambo y evaluar la posible actividad antioxidante de su aceite esencial.

MÉTODOS: el aceite esencial fue obtenido de la corteza de *C. malambo* por hidrodestilación, la composición química volátil fue determinada mediante cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas. La capacidad antioxidante del aceite esencial de *C. malambo* se realizó a través del ensayo de decoloración del catión radical ABTS⁺.

RESULTADOS: el compuesto mayoritario encontrado en el aceite esencial de *C. malambo* fue el metil eugenol (63,5 %) y el linalool (5,6 %). La actividad antioxidante total obtenida fue de 2,2 mmol trolox/kg de aceite esencial.

CONCLUSIONES: el aceite esencial de *C. malambo* está formado por compuestos químicos de amplio uso en la industria farmacéutica. No presentó una marcada actividad antioxidante comparadas con las del BHA, BHT, α -tocoferol.

Palabras clave: *Croton malambo* H. Karst., cromatografía de gases, aceite esencial, actividad antioxidante.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the use of plants for therapeutic purposes in traditional medicine is an important legacy that previous generations have left and a part of the culture of peoples. There are numerous studies on essential oils, in which its usefulness in various areas such as the manufacture of perfumes, cosmetics, flavors, pharmaceutical industry, etc. are highlighted. Several researches reported on the various biological activities having essential oils (insecticides, antioxidant, antibacterial effect, etc.). *Croton malambo* H. Karst. belongs to the family Euphorbiaceae, it is an aromatic small tree growing in the Colombian northern coast and in eastern Venezuela. This species has cytotoxic activity, proapoptosis and anti-inflammatory activity.

OBJECTIVE: to study the volatile chemical composition of essential oil of *C. malambo* and to evaluate the possible antioxidant activity of essential oil.

METHODS: the essential oil was obtained from the *Croton malambo* H. Karst bark. by hydrodistillation, the volatile chemical composition was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry detector (GC-MS). The antioxidant potential of essential oil of *C. malambo* was determined by decoloration assay of stable radical cation ABTS⁺.

RESULTS: the major components found in the essential oil of *C. malambo* were methyl eugenol (63,5 %) and linalool (5,6 %). The TAA obtained was 2,2 mmol trolox/kg essential oil.

CONCLUSIONS: the essential oil of *C. malambo* is formed by chemical compounds widely used in the pharmaceutical industry. It did not provide a strong antioxidant activity compared with the activity of BHA, BHT, α -tocopherol.

Key words: *Croton malambo* H. Karst., gas chromatography, essential oil, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son utilizados desde la antigüedad por sus distintas propiedades organolépticas y de bioactividad,^{1,2} lo que resulta de mucho interés para la industria y la población en general porque genera una importante fuente económica y además reduce la utilización de sustancias sintéticas, lo cual denota mucha atención por los efectos anticancerígenos que en los últimos años se han reportado para esas sustancias.³

La introducción de plantas aromáticas tropicales, oriundas de América del Sur a otros continentes y su exploración, muestra la gran variedad de quimiotipos observados, que poseen esencias exóticas y únicas, lo que hace importante el estudio de plantas colombianas, a fin de encontrar su aplicación práctica como aromatizantes, agentes para saborizar, y(o) principios activos en preparados farmacológicos, cosméticos, perfumes y aditivos en alimentos, entre otros.⁴

A la familia Euphorbiaceae pertenecen principalmente árboles, arbustos y plantas herbáceas a menudo con látex blanco. Incluye la familia unos 300 géneros y alrededor de 5 000 especies distribuidas mayormente en zonas tropicales, subtropicales y también en zonas templadas.^{5,6} Tiene importancia económica mundial, porque algunas especies son productoras de numerosas sustancias utilizadas en la industria, como son el caucho natural y diversos aceites.⁷ *Croton malambo* H. Karst., es un árbol pequeño que crece en la costa norte colombiana y en la región oriental venezolana, conocido por los nativos como malambo y palomatías.⁸ Esta especie presenta actividad citotóxica, proapoptótica⁹ y actividad antiinflamatoria.¹⁰ La corteza de *C. malambo* es ampliamente utilizada en infusión como agente antiinflamatorio, analgésico y para el tratamiento de diversas enfermedades como la diabetes, diarreas, reumatismo y úlceras gástricas.¹⁰

La permanente búsqueda de nuevos productos y combinaciones de sustancias químicas de origen natural, con potencial aplicación en diferentes industrias, como la farmacéutica, de alimentos, textil, química orgánica fina y, sobre todo, cosmética y de perfumes, impulsó esta investigación hacia un detallado estudio de los metabolitos secundarios volátiles de la corteza de *C. malambo*, y la evaluación de su actividad biológica, particularmente, la capacidad antioxidante y su toxicidad aguda frente a *Artemia franciscana*.

MÉTODOS

Material vegetal: la corteza de *Croton malambo* H. Karst., fue recolectada en el Jardín Botánico Guillermo Piñeres ubicado cerca del municipio de Turbaco, Bolívar, Colombia. La identificación taxonómica del árbol se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). Los pliegos testigo de cada planta quedaron depositados como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL): *Croton malambo* H. Karst. (Nº COL522901), Las plantas fueron clasificadas por el Dr. Jhon Infante Betancour.

Hidrodestilación (HD): esta se llevó a cabo en un equipo de destilación tipo Clevenger, según los procedimientos descritos por Stashenko y otros.^{4,11} Se usaron 500 g de corteza seca y molida, sumergida en agua, la duración de la hidrodestilación fue de 2 h. El aceite esencial (AE) se separó del agua por decantación y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Una alícuota del aceite (30 µL) se diluyó en 1 mL de diclorometano para el análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico: se realizó en un GC Hewlett-Packard (HP) 5890A Series II, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 1:30) y

un detector de ionización en llama (FID) (250°C). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con energía de 70 eV, en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación *split* de 1:30), un inyector automático *Agilent 7863*, un sistema de datos (*HP ChemStation 1.05*), incluidas las bases de datos NBS 75K, WILEY 138K y NIST 98. Se usó una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS de 50 m x 0,25 mm DI (detector de ionización), con fase estacionaria de 5 %-fenil-poli(metilsiloxano) de 0,25 µm de grosor. El gas de arrastre fue helio (99,995 %, *Aga Fano, S.A.*), con una velocidad lineal de 35 cm.s⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (15 min) hasta 250 °C (15 min) @ 5 °C min⁻¹ de acuerdo con la metodología descrita por *Stashenko* y otros.¹⁰⁻¹² Para la identificación de los compuestos se usaron algunos terpenos estándar, analizados bajo las mismas condiciones instrumentales que las muestras, espectros de masas e índices de retención de Kováts de componentes, que se compararon con los reportados en la literatura.¹²⁻¹⁴

Evaluación de la actividad antioxidante (TAA)

La evaluación de actividad antioxidante fue realizada de acuerdo con la metodología descrita por *Re* y otros.¹⁵ Inicialmente se preparó la solución del catión radical ABTS⁺, que pesó 3,34 mg de K₂S₂O₈ y se mezcló esta sal con 19,6 mg de ABTS⁺; hasta completar el volumen con agua grado HPLC a 5 mL. La solución se almacenó durante 16 h previas a la evaluación. Para la preparación de las soluciones patrones se pesaron 200 mg de la muestra de aceite y se completó el volumen con etanol hasta 0,5 mL, a partir de esta se prepararon concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 mg/mL, de cada una de estas concentraciones se tomaron 30 µL y se mezclaron con 3 mL de la solución de ABTS⁺, y la absorbancia de la mezcla fue registrada luego de transcurrir 6 min, en un equipo UV-VIS (*Thermoespectronic Génesis 20*) a 734 nm. Se determinó la disminución de la absorbancia con respecto a un blanco del solvente (etanol), y con esto se calculó el porcentaje de inhibición, con lo cual se obtuvo la actividad antioxidante total (TAA) expresada en mmol de Trolox /kg AE (el Trolox fue utilizado como sustancia patrón).

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra un perfil cromatográfico de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles del aceite esencial de *C. malambo* obtenido por hidrodestilación.

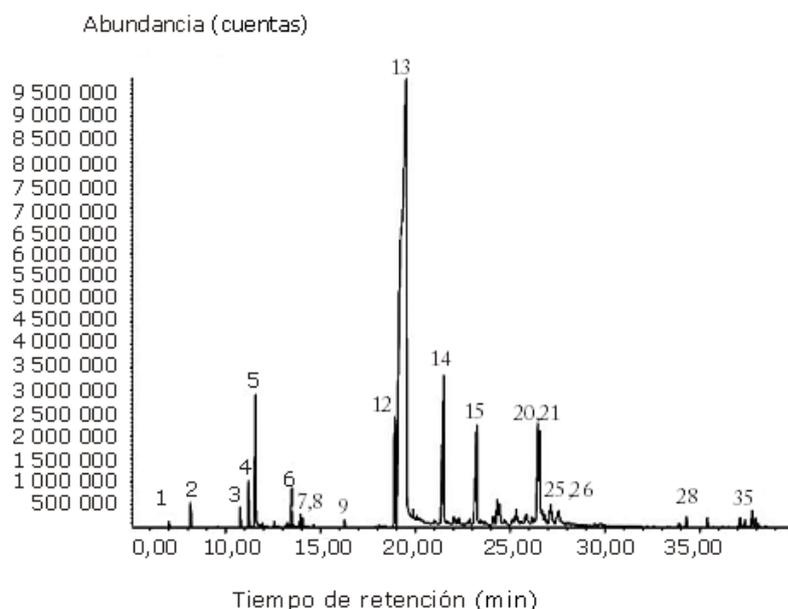


Fig. 1. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst., obtenido por hidrodestilación. Columna HP-5 (30 m), *split* 1:30. En la tabla 1 aparece la respectiva identificación de los picos cromatográficos.

Como se puede apreciar en la tabla 1, se encontraron 35 metabolitos secundarios en concentraciones superiores a 0,1 %. El rendimiento de aceite esencial obtenido fue de 1,2 %. El principal compuesto encontrado fue el metil eugenol (63,5 %), identificado por comparación de su espectro de masas con el del compuesto patrón. Otros compuestos encontrados en alta proporción fueron linalool (5,6 %), β -elemeno (3,6 %), *trans*- β -cariofileno (2,5 %), germacreno D (1,6 %), *trans*-metil isoeugenol (1,5 %), α -copaeno (1,4 %).

Tabla 1. Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *Croton malambo* H. Karst., colombiano

No. de pico	Compuesto	Índice de Kováts	Área relativa ^c (%)
			Hidrodestilación
1	α -pineno	939	0,4 \pm 0,22
2	β -pineno	979	1,0 \pm 0,10
3	<i>cis</i> -óxido linalool	1 073	0,5 \pm 0,25
4	<i>trans</i> -óxido linalool	1 089	1,1 \pm 0,12
5	linalool	1 097	5,6 \pm 0,15
6	borneol	1 160	0,7 \pm 0,25
7	<i>p</i> -ment-1-en-9-ol	1 280	0,2 \pm 0,33
8	acetate de bornilo	1 288	0,5 \pm 0,15
9	α -ylangeno	1 378	0,6 \pm 0,10
10	α -copaeno	1 384	1,4 \pm 0,33
11	β -bourboneno	1 393	0,4 \pm 0,25
12	β -elemeno	1 395	3,6 \pm 1,22

13	metil eugenol	1 400	63,5 ± 0,25
14	<i>trans</i> -β-cariofileno	1 434	2,5 ± 1,25
15	α-gurjuneno	1 444	1,3 ± 0,25
16	β-guaieno	1 446	0,4 ± 0,12
17	<i>Allo</i> -aromadendreno	1 462	0,6 ± 0,12
18	α-humuleno	1 470	0,2 ± 0,12
19	γ-muuroleno	1 484	0,3 ± 0,21
20	germacreno D	1 494	1,6 ± 0,02
21	<i>trans</i> -metil isoeugenol	1 496	1,5 ± 0,52
22	β-selineno	1 502	0,2 ± 0,22
23	α-muuroleno	1 506	0,3 ± 0,31
24	α-bulneseno	1 510	0,4 ± 0,25
25	δ-amorfeno	1 514	0,8 ± 0,16
26	δ-cadineno	1 527	0,6 ± 0,25
27	<i>trans</i> -γ-bisaboleno	1 534	0,3 ± 0,25
28	elemicina	1 546	1,2 ± 0,25
29	β-calacoreno	1 553	0,3 ± 0,12
30	spatulenol	1 591	0,1 ± 0,03
31	<i>trans</i> - hidrato de sesquisabineno	1 596	0,7 ± 0,02
32	óxido de cariofileno	1 598	0,6 ± 0,02
33	guaiaol	1 602	0,5 ± 0,62
34	epóxido de humuleno (II)	1 627	0,7 ± 0,12
35	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	1 629	0,5 ± 0,03

tr: trazas, a: número de pico en la figura 1,
 b: índice de Kováts determinado experimentalmente en columna HP-5,
 c: promedio de 4 extracciones ± ts/√n (n = 4; 95% confianza).

Los cálculos de la actividad antioxidante total (TAA) del AE de *C. malambo* se realizaron hallando la relación entre la pendiente del porcentaje de inhibición vs. concentración (mM) para el Trolox (análogo de la vitamina E) y la pendiente del porcentaje de inhibición vs. concentración (mM) del aceite esencial (Fig. 2), donde se obtuvo en promedio un valor de 2,28 mmol Trolox/kg AE.

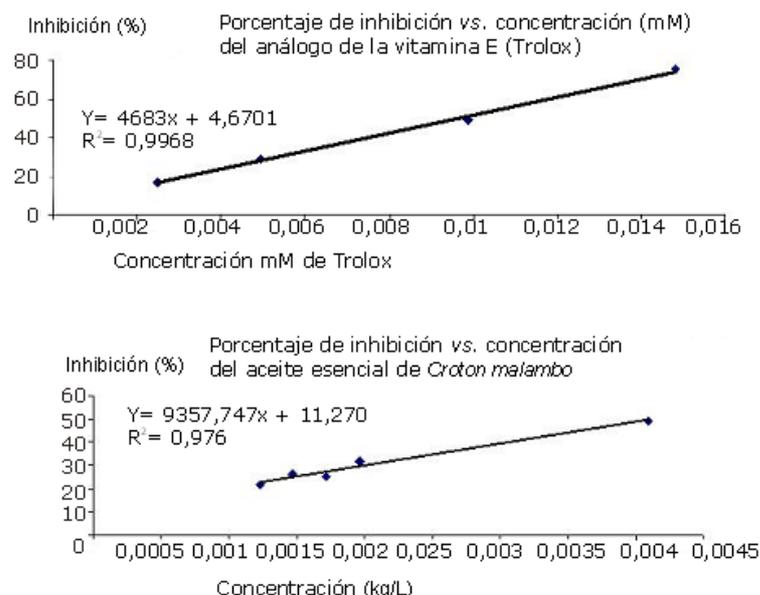


Fig. 2. Relación entre la pendiente del porcentaje de inhibición vs. concentración (mM) para Trolox (análogo de la vitamina E) y la pendiente del porcentaje de inhibición vs. concentración (mM) del aceite esencial de *Croton malambo*.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la capacidad atrapadora de radicales del AE de *C. malambo* comparada con la de sustancias antioxidantes referenciadas (butilhidroxianisol [BHA], butilhidroxitolueno [BHT], α -tocoferol).

Tabla 2. Valores de la actividad antioxidante total para el aceite esencial de *Croton malambo* y sustancias de referencia que utilizan el catión radical ABTS⁺

Sustancias de referencia o aceite esencial	TAA (mmol Trolox/kg AE)
	Promedio \pm DE
α -tocoferol	2 950 \pm 33
BHT	990 \pm 31
BHA	6 900 \pm 487
AE de <i>C. malambo</i>	2,28 \pm 0,4

TAA: actividad antioxidante total, AE: aceite esencial; BHT: butilhidroxitolueno, BHA: butilhidroxianisol

DISCUSIÓN

El aceite esencial colombiano de *C. malambo* se distingue por su alto contenido de metil eugenol (63,5 %). Esta sustancia es un componente común de las especias, como el estragón, el hinojo, mejorana, pimienta de Jamaica, anís estrellado, anís y albahaca.¹⁶⁻¹⁹ El metil eugenol es un importante compuesto bioactivo con un amplio rango de aplicaciones en las industrias farmacéutica y aromatizante, bebidas no alcohólicas, condimentos, dulces duros y blandos.^{20,21} También se utiliza como regulador del crecimiento de insectos para evitar el apareamiento de las moscas en

el campo de cultivo de cítricos.^{16,17} La composición química volátil del AE del *C. malambo* estudiado fue similar a la reportada por Suárez y otros¹⁰ para el AE de corteza de *C. malambo* de Venezuela obtenido por hidrodestilación, donde los compuestos mayoritarios encontrados fueron el metil eugenol, isoeugenol de metilo y elemicina. Sin embargo, el isoelemicina, veratral y δ -cadinol no fueron encontrados en el AE de *C. malambo* colombiano.

La capacidad antioxidante del aceite esencial de *C. malambo* fue baja en comparación con los antioxidantes BHA, BHT, y α -tocoferol. Esto puede ser atribuido a que en la composición del AE hay ausencia de fenoles (donadores de hidrógeno) que en la mayoría de los AE son quienes confieren la capacidad antioxidante.²²⁻²⁵ Los compuestos utilizados como referencia (BHA, BHT, y α -tocoferol), en su estructura presentan un grupo OH que participa en esta actividad según estudios reportados,^{23,26} y en el metil eugenol este grupo se encuentra sustituido por un grupo -CH₃, lo cual puede hacer que pierda la actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigaciones Agroquímicas de la Universidad de Cartagena y CENIVAM de la Universidad Industrial de Santander. Al doctor *Jesús Olivero* y su Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nerio LS, Olivero J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: A review. *Biores Technol.* 2010;101(1):372-8.
2. Qin W, Huang S, Li C, Chen S, Peng Z. Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae). *Pest Biochem Phys.* 2010;96(3):132-9.
3. Bera D, Lahiri D, Nag A. Studies on a natural antioxidant for stabilization of edible oil and comparison with synthetic antioxidants. *J Food Eng.* 2006;74(4):542-5.
4. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J Chromatogr A.* 2004;1025:93-103.
5. Webster GL. Classification of Euphorbiaceae. *Ann Missouri Bot Gard.* 1994;81:3-32.
6. Webster GL. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 1994;81:33-144.

7. Radulovic N, Mananjarasoa E, Harinantenaina L, Yoshinori A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. *Biochem Syst Ecol.* 2006;34:648-53.
8. Morales A, Pérez P, Mendoza R, Compagnone R, Suarez A, Arvelo F, et al. Cytotoxic and proapoptotic activity of ent-16 α -17 α -dihydroxykaurane on human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Cancer Letters.* 2005;218(1):109-16.
9. Murillo J. Las Euphorbiaceae de Colombia. *Biota Colombiana.* 2004;5(2):183-200.
10. Suárez A, Compagnone R, Salazarbookaman M, Tillett S, Monache F, Digiulio C, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 2003;88(1):11-4.
11. Stashenko EE, Quiroz N, Martínez JR. HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD study of colombian Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. *J High Res Chromatogr.* 1996;19(6):359-62.
12. Davies NW. Gas chromatography retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. *J Chromatogr A.* 1990;503:1-24.
13. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream (Illinois): Allured Publishing Corporation; 1995. p. 469.
14. Joulain D, König W. The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Hamburg: E.B.-Verlag; 1998. p. 658.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical-cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1231-7.
16. Brennan RJ, Kandikonda S, Khrimian AP, DeMilo AB, Liquido NJ, Schiestl RH. Saturated and monofluoro analogs of the oriental fruit fly attractant methyl eugenol show reduced genotoxic activities in yeast. *Mut Res.* 1996;369:175-81.
17. Wei Hee AK, Tan KH. Transport of methyl eugenol-derived sex pheromonal components in the male fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. *Comp Biochem Physiol C.* 2006;143:422-8.
18. Lewinsohn E, Ziv-Raz I, Dudai N, Tadmor Y, Lastochkin E, Larkov O. et al. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Developmental and chemotypic association of allylphenol *O*-methyltransferase activities. *Plant Sci.* 2000;160:27-35.
19. López MD, Jordán MJ, Pascual-Villalobos MJ. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *J Stored Prod Res.* 2008;4:273-8.
20. Smith RL, Adams TB, Doull J, Feron VJ, Goodman JI, Marnett LJ, et al. Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances - methyl eugenol and estragole. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(7):851-70.

21. Sanjana K, Masood W, Kanyaha LD, Manoj K.D. Production and GC-MS trace analysis of methyl eugenol from endophytic isolate of *Alternaria* from rose. *Annals Microbiol.* 2008;58(3):443-5.
22. Moyer RA, Hummer K, Fin CE, Frei B, Wrolstad R. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: vaccinium, rubus, and ribes. *J Agric Food Chem.* 2002;50(3):519-25.
23. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem.* 1998;46(10):4113-7.
24. Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 1999;47(10):3954-62.
25. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5165-70.
26. Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA. *J Agric Food Chem.* 1997;45(3):632-8.

Recibido: 24 de mayo de 2010.

Aprobado: 26 de septiembre de 2010.

Dra. *Beatriz Eugenia Jaramillo Colorado*. Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Campus de Zaragocilla, Cartagena, Bolívar, Colombia. Telefax: 57-5-6698180. Correo electrónico: beatrizjaramillo@yahoo.com