

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

**DETERMINACIÓN DE LA  
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE  
DIFERENTES QUIMIOTIPOS DE  
ACEITE ESENCIAL DE *ARTEMISIA  
ABSINTHIUM* L.**

**Trabajo de Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**Curso 2015/2016**

Autora: D<sup>a</sup> María José Corell Vidal

Tutor académico: Profesor Dr. D. Juan Antonio Llorens Molina

Primer cotutor: Profesor Dr. D. Vicente Castell Zeising

Directora experimental: Dra. D<sup>a</sup> Sandra Vacas González

**Valencia, a 7 de Julio de 2016**



Autora: Alumna D<sup>a</sup> María José Corell Vidal

Valencia, a 7 de Julio de 2015

Tutor académico: Profesor Dr. D. Juan A. Llorens Molina

## RESUMEN

### **Determinación de la actividad antioxidante de diferentes quimiotipos de aceite esencial de *Artemisia absinthium* L.**

Se obtuvieron los aceites esenciales de tres quimiotipos de *Artemisia absinthium* L. (ajenjo) por hidrodestilación. La separación e identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS) en columna apolar ZB-5. Para ello se compararon los espectros de masas de los picos de cada uno de los cromatogramas correspondientes a los tres quimiotipos estudiados, con los de las bases de datos Adams (2007) y NIST (2011). Asimismo, se calcularon los índices de retención de Kovats para cada compuesto, comparándose con los referidos en la bibliografía.

Los quimiotipos españoles mostraron un alto contenido en (*Z*)-epoxiocimeno (61,9% en el quimiotipo A y 36,03% en el B), (*E*)-epoxiocimeno (10,7% en el quimiotipo A y 10,43% en el B), y alcanfor (5,1% en el quimiotipo A) y, junto a estos compuestos, una elevada proporción de acetato de (*Z*)-crisantemilo (35,38%) en el quimiotipo B; estando en ambos casos prácticamente exentos de  $\beta$ -tuyona (compuesto neurotóxico). En el quimiotipo procedente de Hungría los compuestos mayoritarios fueron  $\beta$ -tuyona (28%), sabineno (13,8%), mirceno (16,6%) y  $\gamma$ -gurjuneno (5,2%).

Como una primera aproximación a las diferencias en actividad antioxidante de estos aceites esenciales, se evaluó la capacidad de captación de radicales de los aceites usando el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) comparando el quimiotipo B español (el más representativo) y el húngaro. Posteriormente se llevó a cabo un ensayo bioautográfico mediante cromatografía en capa fina con objeto de detectar a qué compuestos puede atribuirse la actividad antioxidante observada. De los resultados de este ensayo se desprende, de cara a posteriores estudios, la potencialidad como agentes antioxidantes de compuestos tales como los isómeros de epoxiocimeno, el camazuleno y los derivados de nuciferol.

**Palabras clave:** *Artemisia absinthium* L., aceite esencial, composición química, actividad antioxidante.

Author: Alumna D<sup>a</sup> María José Corell Vidal

Valencia, 7<sup>th</sup> of July, 2015

Academic tutor: Profesor Dr. D. Juan A. Llorens Molina

## ABSTRACT

### **Determination of antioxidant activity of different chemotypes of *Artemisia absinthium* L. essential oil.**

Essential oils of three chemotypes of *Artemisia absinthium* L. (wormwood) were obtained by hydrodistillation. The separation and identification of their components was carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) in a non-polar ZB-5 column. For this purpose, the mass spectra for peaks belonging to chromatograms of three chemotypes were compared with the ones coming from Adams (2007) and NIST (2011) libraries. Likewise, the Kovat's retention indices for each compound were calculated and compared with those reported in the bibliography.

The Spanish chemotypes showed a high content of (*Z*)-epoxyocimene (61,9% in the chemotype A and 36,03% in the B), (*E*)-epoxyocimene (10,7% in the chemotype A y 10,43% in the B) and camphor (5,1% in the chemotype A) and, together with these compounds, a high proportion of (*Z*)-Chrysantemyl acetate (35,38%) was found in the chemotype B. Both essential oils were practically free of  $\beta$ -thujone (neurotoxic compound).  $\beta$ -thujone (28%), sabinene (13,8%), myrcene (16,6%) and  $\gamma$ -gurjunene (5,2%) were found the major compounds in the Hungarian chemotype.

As a first approach to study the differences in antioxidant activity of these essential oils, a free radical scavenging assay was carried out using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The most representative Spanish chemotype (B) was compared against the Hungarian one. Subsequently, in order to determine which compounds can be attributed to the antioxidant activity a bioautographic test by TLC (thin layer chromatography) was also performed. These results show the potential usefulness, for later studies, of compounds such as epoxyocimene isomers, chamazulene and nuciferol derivatives as antioxidant agents.

**Keywords:** *Artemisia absinthium* L., essential oil, chemical composition, antioxidant activity.

Autor: Alumna D<sup>a</sup> María José Corell Vidal

València, a 7 de Juliol de 2015

Tutor acadèmic: Professor Dr. D. Juan A. Llorens Molina

## RESUM

### **Determinació de l'activitat antioxidant de diferents quimiotipus d'oli essencial d'*Artemisia absinthium* L.**

Es van obtenir els olis essencials de tres quimiotipus d'*Artemisia absinthium* L. (donzell) per hidrodestil·lació. La separació i identificació dels compostos es va dur a terme mitjançant cromatografia de gasos-espectrometria de masses (GC/MS) en columna apolar ZB-5. Per a això es van comparar els espectres de masses dels pics de cada un dels cromatogrames corresponents als tres quimiotipus estudiats, amb els de les bases de dades Adams (2007) i NIST (2011). Així mateix, es van calcular els índexs de retenció de Kovats per a cada compost, comparant-se amb els referits a la bibliografia.

Els quimiotipus espanyols van mostrar un alt contingut en (*Z*)-epoxiocimé (61,9% en el quimiotipus A i 36,03% en el B), (*E*)-epoxiocimé (10,7% en el quimiotipus A i 10,43% en el B) i càmfora (5,1% en el quimiotipus A) i, al costat d'aquests compostos, una elevada proporció d'acetat de (*Z*)-crisantemil (35,38%) al quimiotipus B; estant ambdós casos pràcticament exempts de  $\beta$ -tuiona (compost neurotòxic). En el quimiotipus procedent d'Hongria els compostos majoritaris van ser  $\beta$ -tuiona (28%), sabiné (13,8%), mircé (16,6%) i  $\gamma$ -gurgujé (5,2%).

Com una primera aproximació a les diferències en activitat antioxidant d'aquests olis essencials, es va avaluar la seua capacitat de captació de radicals mitjançant la reacció amb el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) comparant el quimiotipus B espanyol (el més representatiu) i l'hongarès. Posteriorment es va dur a terme un assaig bioautogràfic mitjançant cromatografia amb capa fina per tal de detectar a quins compostos es pot atribuir l'activitat antioxidant observada. Dels resultats d'aquest assaig es desprèn, de cara a posteriors estudis, la potencialitat com a agents antioxidants de compostos com ara els isòmers d'epoxiocimé, el camazulè i els derivats de nuciferol.

**Paraules clau:** *Artemisia absinthium* L., oli essencial, composició química, activitat antioxidant.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al director de este trabajo D. Juan Antonio Llorens Molina, por haber despertado mi interés en el campo de la investigación de los aceites esenciales, por confiarme la oportunidad de realizar este estudio, por el seguimiento, la orientación, la supervisión continua y por sus correcciones realizadas.

A Amparo Martínez-Fuentes por el tiempo dedicado a este proyecto, tanto para la realización de las determinaciones espectrofotométricas como en las múltiples repeticiones de las mismas.

A Sandra Vacas González por la ayuda proporcionada en la parte de cromatografía y en las correcciones realizadas.

Al Departamento de Química por poner a mi disposición sus laboratorios y el material necesario para realizar el trabajo.

A toda mi familia, en especial a mis padres por haberme brindado la posibilidad de seguir estudiando sin ponerme impedimentos, por animarme y por toda la ayuda prestada durante mis estudios.

A mis compañeros de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos y por sus apoyos y ayudas cuando los he necesitado.

Gracias a todos.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 MORFOLOGÍA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 USOS TRADICIONALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.4 COMPOSICIÓN Y TOXICIDAD</b> .....	<b>2</b>
<b>1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>5</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1 MATERIAL VEGETAL</b> .....	<b>7</b>
<b>3.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL</b> .....	<b>8</b>
3.2.1 MATERIALES .....	8
3.2.2 FUNDAMENTO .....	8
3.2.3 METODOLOGÍA .....	9
<b>3.3 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES</b> .....	<b>10</b>
3.3.1 MATERIALES .....	10
3.3.2 FUNDAMENTO .....	10
3.3.3 METODOLOGÍA .....	10
<b>3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>12</b>
3.4.1 ENSAYO DPPH.....	12
3.4.1.1 MATERIALES .....	12
3.4.1.2 FUNDAMENTO .....	12
3.4.1.3 METODOLOGÍA.....	13
3.4.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC) .....	14
3.4.2.1 MATERIALES .....	14
3.4.2.2 FUNDAMENTO .....	14
3.4.2.3 METODOLOGÍA.....	14
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL</b> .....	<b>17</b>
<b>4.2 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 ENSAYO DPPH</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)</b> .....	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de <i>A. absinthium</i> de diferente procedencia.....	<b>2</b>
<b>Tabla 2.</b> Cantidad destilada y rendimiento de la destilación de los tres quimiotipos de <i>A. absinthium</i> . .....	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Composición química de las partes aéreas de los tres quimiotipos de <i>A. absinthium</i> . .....	<b>19</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ajenjo español (quimiotipos A y B) cultivado en parcela de la Universitat Politècnica de València. ....	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b> Ajenjo húngaro (quimiotipo H) cultivado en parcela de la Universitat Politècnica de València. ....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Equipo Clevenger.....	<b>8</b>
<b>Figura 4.</b> Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.....	<b>13</b>
<b>Figura 5.</b> Prototipo de las medidas de las capas finas empleadas para determinar las bandas de actividad antioxidante de los tres quimiotipos de <i>A. absinthium</i> . ....	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> GC/MS cromatograma completo correspondiente al quimiotipo A con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>17</b>
<b>Figura 7.</b> GC/MS cromatograma parcial correspondiente al quimiotipo A con la identificación de los componentes mayoritarios en un intervalo de tiempo de retención entre 6,70 y 16,70.....	<b>18</b>
<b>Figura 8.</b> GC/MS cromatograma parcial correspondiente al quimiotipo A con la identificación de los componentes mayoritarios en un intervalo de tiempo de retención entre 18,80 y 48,80. ....	<b>18</b>
<b>Figura 9.</b> GC/MS cromatograma completo correspondiente al quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>18</b>
<b>Figura 10.</b> GC/MS cromatograma completo correspondiente al quimiotipo húngaro con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>19</b>
<b>Figura 11.</b> Estructuras químicas de los cuatro componentes mayoritarios de los quimiotipos A y B (españoles) de <i>A. absinthium</i> . ....	<b>21</b>
<b>Figura 12.</b> Estructuras químicas de los cuatro componentes mayoritarios del quimiotipo H (húngaro) de <i>A. absinthium</i> . ....	<b>22</b>
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de captación del radical DPPH frente a la concentración del aceite esencial del quimiotipo B. ....	<b>23</b>
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de captación del radical DPPH frente a la concentración del aceite esencial del quimiotipo H. ....	<b>24</b>
<b>Figura 15.</b> Cromatografía en capa fina de las bandas correspondientes a los compuestos mayoritarios de los tres quimiotipos de <i>A. absinthium</i> pulverizados con vainillina (izquierda) y anisaldehído (derecha), observada mediante radiación ultravioleta ( $\lambda = 365$ nm).....	<b>25</b>
<b>Figura 16.</b> Cromatografía en capa fina de las bandas de actividad antioxidante de los tres quimiotipos de <i>A. absinthium</i> pulverizados con DPPH.....	<b>26</b>

<b>Figura 17.</b> Bandas con actividad antioxidante del quimiotipo B, en las que la fase estacionaria fue separada y su extracto en diclorometano analizado por GC/MS para la determinación de sus componentes.....	<b>26</b>
<b>Figura 18.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 1 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>27</b>
<b>Figura 19.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 2 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>27</b>
<b>Figura 20.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 3 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>27</b>
<b>Figura 21.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 4 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>27</b>
<b>Figura 22.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 5 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>28</b>
<b>Figura 23.</b> Bandas con actividad antioxidante del quimiotipo H, en las que la fase estacionaria fue separada y su extracto en diclorometano analizado por GC/MS para la determinación de sus componentes. ....	<b>28</b>
<b>Figura 24.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 1 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios.....	<b>28</b>
<b>Figura 25.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 2 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>29</b>
<b>Figura 26.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 3 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>29</b>
<b>Figura 27.</b> GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 4 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios. ....	<b>29</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 MORFOLOGÍA**

El ajenjo pertenece a la familia *Asteraceae*, género *Artemisia*, uno de los géneros más grandes en su familia. Es una planta leñosa, que cada año produce desde su base ramas erectas, que se secan en otoño tras la fructificación. Las partes basales de estas ramas permanecen durante el invierno y, en la estación siguiente, se producen nuevas ramas a partir de sus yemas. Toda la planta es de un color verde-grisáceo tanto en tallo como en hojas (alternas), que generalmente son de pequeño tamaño (Ariño, 1999). Los rasgos más característicos del género se encuentran en las cabezas de las flores o capítulos, los cuales son pequeños, esféricos, ovoides o cilíndricos y están compuestos únicamente de flores sésiles insertadas sobre un receptáculo común rodeado por un involucre de brácteas. El número de flores por cabeza oscila a partir de 4-7 a más de 40, y las corolas son de color blanquecino, amarillo o púrpura, y no muy llamativo. La mayoría de las especies de *Artemisia* son de floración tardía, es decir, florecen a finales de verano, otoño o incluso invierno (Vallès *et al.*, 2011).

### **1.2 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA Y CLIMA**

El género *Artemisia* se encuentra pobremente representado en el hemisferio sur y ampliamente distribuido en el hemisferio norte, con mayor riqueza en Eurasia (Vallès y McArthur, 2001). Crece en una amplia variedad de condiciones ambientales, a menudo en hábitats antrópicos por lo general cerca de las áreas urbanas, tales como eriales, etc. En la Península Ibérica, su hábitat óptimo se encuentra en áreas continentales entre 800 y 1500 m sobre el nivel del mar. A pesar de que requiere una precipitación media anual superior a 400 mm, resiste la sequía y las heladas (Llorens-Molina y Vacas, 2015). Debido a su elevada resistencia, algunas especies del género se han introducido en territorios en los que no son autóctonas y algunas de ellas han desarrollado un carácter invasivo (Vallès *et al.*, 2011).

### **1.3 USOS TRADICIONALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

A pesar de que algunos grupos taxonómicos son malas hierbas invasoras que pueden afectar negativamente a las cosechas, existe un gran número de especies de *Artemisia* que tiene un alto valor económico para alimentos, medicinas, forraje, plantas ornamentales, y otros usos (Vallès y McArthur, 2001). Al ajenjo se le atribuye un buen número de propiedades relacionadas con el aparato digestivo ya que estimula la secreción de jugos gástricos y de bilis tanto por la vesícula biliar como por el hígado y protege frente a dolencias hepáticas. Otras propiedades medicinales descritas en esta planta son tratamientos contra la fiebre crónica, actúa como afrodisíaco, promueve el sudor y ha sido empleada contra trastornos reumáticos debido a su actividad antiinflamatoria. Por su propiedad insecticida se ha utilizado para repeler mosquitos y pulgas y frente a la polilla. Desde muy antiguo se ha utilizado contra los parásitos intestinales, de donde deriva su nombre en inglés

“wormwood” (worm=gusano; wood=madera), en el tratamiento de la malaria y como antídoto para el opio y otros venenos depresores del sistema nervioso central (Ariño, 1999). El aceite esencial de *A. absinthium* muestra actividad antibacteriana contra patógenos humanos comunes (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*) y propiedades acaricidas (Abad *et al.*, 2012). El interés por reducir la aplicación de los productos químicos de síntesis en agricultura impulsó la investigación de la *A. absinthium* en relación a su efecto antihelmíntico y alelopático (Bara *et al.*, 1999). Además de por sus virtudes medicinales, el ajeno fue también muy utilizado como aromatizante alimentario desde la antigüedad. A finales del S. XVIII se elaboró la fórmula de la absenta en Suiza donde el aceite esencial de ajeno y el alcohol constituyen los ingredientes básicos. A finales del S. XIX, se observó que el consumo prolongado de esta bebida producía un síndrome adictivo, llamado absintismo, caracterizado por insomnio, aturdimiento, delirios, pesadillas, temblor, debilitamiento intelectual, alucinaciones y ataques epilépticos. Algunos autores, sin embargo, afirman que la toxicidad de la absenta se debía al elevado contenido en alcohol de esta bebida. El ajeno se ha utilizado también, en menor medida, como sustituto del lúpulo en la fabricación de cerveza y como sustituto de la menta en el té (Ariño, 1999).

#### 1.4 COMPOSICIÓN Y TOXICIDAD

Se han realizado diversos estudios sobre la composición del aceite esencial de *A. absinthium* de plantas procedentes de distintas zonas geográficas o de distintos individuos de origen común, que muestran una gran variabilidad en la composición tal y como se presenta en la tabla 1.

**Tabla 1.** Tabla bibliográfica de los componentes mayoritarios (>5%) de las partes aéreas de *A. absinthium* de diferente procedencia.

Referencias Parte de la planta/Etapa de cosecha	Localización	Componentes (>5%)
<b>Baykan Erel <i>et al.</i>, 2012</b>	Anatolia (Turquía)	Sabineno (17,56%), Mirceno (10,96%), $\alpha$ -Felandreno (5,37%), Miróxido (5,76%), Acetato de crisantemilo (10,97%), Acetato de ( <i>E</i> )-sabinilo (7,71%)
<b>Blagojević <i>et al.</i>, 2006</b>	Mokra, Bela Palanka (Serbia)	Sabineno (8,1%), $\beta$ -Tuyona (19,8%), ( <i>Z</i> )- $\beta$ -Epoxiocimeno (10,7%), Acetato de ( <i>E</i> )-sabinilo (8,8%), Linalil 3-metilbutanoato (7,5%)
<b>Judzentiene <i>et al.</i>, 2012</b>	1)Klaipeda (oeste de Lituania) 2)Druskininkai, Laterezis (sur de Lituania)	1) Sabineno (5,5%), ( <i>Z</i> )-Tuyona (6,5%), ( <i>E</i> )-Tuyona (11,1%), Acetato de ( <i>E</i> )-sabinilo (37,5%) 2) ( <i>Z</i> )- $\beta$ -Epoxiocimeno (8,5%), Acetato de ( <i>E</i> )-sabinilo (33%)

<b>Llorens-Molina y Vacas, 2015</b> -Vegetación (26/06/2012) -Plena floración-inicio de la maduración del fruto (15/09/2012)	Calamocha, Teruel (España)	-Vegetación: (Z)- $\beta$ -Epoxiocimeno (71,5%), (Z)-Acetato de crisantemilo (10,4%) -Plena floración-inicio de la maduración del fruto: (Z)- $\beta$ -Epoxiocimeno (49,3%), (Z)-Acetato de crisantemilo (17,1%)
<b>Llorens-Molina et al., 2016</b> -Hoja	Calamocha, Teruel (España)	1) <sup>(b)</sup> (Z)- $\beta$ -Epoxiocimeno (78,5%), (E)- $\beta$ -Epoxiocimeno (6,4%)  2) <sup>(c)</sup> (Z)- $\beta$ -Epoxiocimeno (63,7%), (Z)-Acetato de crisantemilo (25,8%)  3) <sup>(d)</sup> (Z)- $\beta$ -Epoxiocimeno (80%), Alcanfor (7,1%)
<b>Lopes-Lutz et al., 2008</b>	Alberta (Canadá)	Mirceno (10,8%), (E)-Tuyona (10,1%), Acetato de (E)-sabinilo (26,4%)
<b>Rezaeinodehi y Khangoli, 2008</b>	Irán	$\beta$ -Pino (23,8%), $\beta$ -Tuyona (18,6%),
<b>Sharopov et al., 2012</b> -Pre-floración (1, 2) -Plena floración (3)	1)Khonaobod, Muminobod (Tajikistan)  2, 3) Chormaghzak, Yovon (Tajikistan)	1) Mirceno (8,6%), Linalool (5,6%), $\beta$ -Tuyona (7,3%), Acetato de linalool (7%), (Z)-Acetato de crisantemilo (15,5%), Germacreno D (8%), Dihidrocamazuleno 1 <sup>(e)</sup> (5,5%)  2) Mirceno (22,7%), $\alpha$ -Felandreno (5,3%), Linalool (5,3%), (Z)-Acetato de crisantemilo (7,7%), Dihidrocamazuleno 1 <sup>(e)</sup> (10,5%), Dihidrocamazuleno 4 <sup>(f)</sup> (6,2%)  3) Mirceno (9,2%), Linalool (7%), (Z)-Acetato de crisantemilo (17,9%), Dihidrocamazuleno 1 <sup>(e)</sup> (11,6%), Dihidrocamazuleno 3 <sup>(g)</sup> (5,7%)
<b>Zanousi et al., 2012</b> -Tallo -Hoja -Fruto	Kojur, Nowshahr, Mazandaran (Irán)	-Tallo: Sabineno (10,05%), $\beta$ -Pino (6,29%), 1,8-Cineol (14,09%), $\beta$ -Tuyona (40,91%), (Z)-Crisantemol (8,92%) -Hoja: Sabineno (9,78%), $\beta$ -Pino (6,28%), 1,8-Cineol (13,58%), $\beta$ -Tuyona (36,44%), (Z)-Crisantemol (8,87%) -Fruto: Sabineno (8,35%), $\beta$ -Pino (8,46%), 1,8-Cineol (8,10%), $\beta$ -Tuyona (24,27%), (Z)-Crisantemol (18,92%)

Las diferencias encontradas entre los principales compuestos del aceite esencial de *A. absinthium* se han relacionado en algunos casos con la zona geográfica y la altitud de la población (Ariño, 1999), así como con la variación estacional (Llorens-Molina y Vacas, 2015). El interés intrínseco del estudio de la composición del aceite esencial radica en que, los compuestos presentes son mayormente los responsables de sus propiedades beneficiosas, pero también de su toxicidad. Así pues, la tuyoona presente un gran número de plantas de ajeno (quimiotipo húngaro del presente trabajo y estudios anteriores como Zanolusi *et al.*, 2012; Blagojević *et al.*, 2006 y Judzentiene *et al.*, 2012, entre muchos otros) es un estimulante del sistema nervioso central, que a dosis elevadas provoca una inhibición del metabolismo oxidativo a nivel cerebral. Por este motivo, las plantas que contienen tuyoona en su composición tienen limitada su utilización en alimentos y bebidas (Ariño, 1999). Sin embargo, se conoce que existen ajenos sin tuyoona o con muy bajas concentraciones (como es el caso de los quimiotipos A y B españoles estudiados en el presente trabajo y otros como los investigados en trabajos anteriores, Baykan Erel *et al.*, 2012; Llorens-Molina y Vacas, 2015 y Llorens-Molina *et al.*, 2016) cuyas aplicaciones en el campo de la alimentación están aún por explotar a beneficio del ser humano.

## 1.5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En los últimos años, debido a las preocupaciones sobre la toxicidad asociadas con el uso de sustancias sintéticas en los alimentos y el aumento de la concienciación acerca de los alimentos naturales, ha habido un creciente interés en el uso de sustancias naturales como conservantes de alimentos y antioxidantes (Pal *et al.*, 2009). Se ha observado que las funciones principales en el cuerpo humano dependen de las reacciones de oxidación que, a su vez, producen especies reactivas de oxígeno como producto intermedio del metabolismo. Las especies reactivas de oxígeno no solo están fuertemente asociadas con la peroxidación de lípidos y el consecuente deterioro de los alimentos, sino que también están involucradas en el desarrollo de enfermedades cancerígenas, por lo que el consumo de alimentos con alto contenido de antioxidantes es importante en la prevención de estas, debido a que son compuestos que pueden retrasar o inhibir la oxidación de lípidos y otras moléculas mediante la inhibición de la propagación de especies reactivas de oxígeno (Martínez-Damián *et al.*, 2013). En este contexto, las plantas aromáticas, en particular sus aceites esenciales, están siendo evaluadas por su actividad antioxidante, ya que poseen un amplio uso en la industria alimentaria y de bebidas (Pal *et al.*, 2009). La actividad antioxidante del aceite esencial de *A. absinthium* procedente de Calamocha, Teruel (España) y Alföld (Hungría), se presenta aquí, por primera vez para extender así, el conocimiento en la gama de actividades biológicas provechosas y posibles terapias y usos en alimentación asociados a esta planta.

## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1 OBJETIVOS**

Los objetivos que se pretenden lograr con la realización de este trabajo son los siguientes:

- 1) Caracterizar la composición química del aceite esencial de *Artemisia absinthium* procedente de dos localizaciones geográficas muy distantes con objeto de confirmar o identificar los quimiotipos a que corresponden. El ajeno procedente de la Península Ibérica corresponde a dos quimiotipos (A y B) identificados previamente en anteriores trabajos, sin embargo, respecto al material vegetal procedente de Alföld ( Hungría), dado que no existe información previa sobre el mismo, es objetivo también de este trabajo la identificación de su quimiotipo.
- 2) Evaluar y comparar la capacidad antioxidante de los quimiotipos caracterizados.
- 3) Identificar aquellos componentes a los que, en principio, se puede atribuir la capacidad antioxidante.

### **2.2 PLAN DE TRABAJO**

Para poder alcanzar los objetivos planteados se llevó a cabo el siguiente plan de trabajo:

- Recolección del material vegetal (partes aéreas), de diez plantas seleccionadas al azar para cada uno de los quimiotipos españoles y para las plantas procedentes de Hungría. La toma de muestras se realizó en plena etapa vegetativa previa a la floración.
- Secado del material vegetal y almacenamiento en congelación hasta el momento de su utilización
- Obtención por hidrodestilación de los aceites esenciales de cada muestra.
- Análisis por cromatografía de gases con espectroscopía de masas como método de detección para determinar la composición de los aceites esenciales y comparación con otros aceites de *Artemisia absinthium* descritos en la bibliografía.
- Realización de un ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) de los quimiotipos B, español (más representativo por incluir la composición del quimiotipo A) y del quimiotipo H, húngaro, para determinar las diferencias en actividad antioxidante de los aceites esenciales estudiados.

- Aplicación de un ensayo bioautográfico mediante cromatografía en capa fina aplicando como reactivo revelador DPPH para identificar las zonas correspondientes a los compuestos con actividad antioxidante. Para determinar con mayor precisión la posición de dichas zonas se desarrollaron paralelamente otros dos ensayos utilizando como reveladores vainillina y anisaldehído.
- Una vez identificadas las zonas con actividad antioxidante se aplicó un método de cromatografía en capa fina preparativa para extraer los compuestos presentes en dichas zonas, que se identificaron posteriormente mediante GC/MS.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Las muestras fueron obtenidas de las partes aéreas de 10 individuos seleccionados al azar en cada una de las parcelas experimentales de *Artemisia absinthium*, de la Universitat Politècnica de València (UPV), correspondientes a los quimiotipos estudiados. La recolección se realizó justo en el momento previo a la floración, desechando las hojas y tallos amarillentos o deteriorados. Por una parte, los quimiotipos españoles A y B, procedían de una población silvestre localizada en Calamocha (40°54'N, 6° 43'W), Teruel (España), caracterizada por estar situada en una zona de vegetación ruderal, con suelo calcáreo y pedregoso. Por otro lado, el quimiotipo húngaro, H, también cultivado en las parcelas de la UPV, procedía del Departamento de Plantas Medicinales y Aromáticas (Corvinus University) en Budapest (Hungria), y que, a su vez, había sido recolectado de su hábitat silvestre con un suelo pobre y arenoso en Alföld (Hungria) (47°54'N, 19°14E). Tras su recolección, el material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente y en ausencia de luz solar entre ocho y diez días, siendo posteriormente homogeneizado y conservado a -25°C hasta el momento de llevar a cabo la extracción del aceite esencial.



**Figura 1.** Ajenjo español (quimiotipos A y B) cultivado en parcela de la Universitat Politècnica de València.



**Figura 2.** Ajenjo húngaro (quimiotipo H) cultivado en parcela de la Universitat Politècnica de València.

## 3.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

### 3.2.1 MATERIALES

- Equipo Clevenger (vidraFOC)
- Manta calefactora (Ibx-Instruments)
- Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.)
- Matraces balón (vidraFOC)
- Viales (20 mL)
- Parafilm (PARAFILM)
- Viales topacio (labbox)
- Embudo
- Bandeja de plástico (Great plastic)
- Vasos de precipitados (PYREX)
- Algodón
- Guantes (semperguard<sup>®</sup>)

#### Reactivos:

- Sulfato de sodio anhidro (Panreac, n° CAS: 7727-73-3)

### 3.2.2 FUNDAMENTO

La extracción del aceite esencial de *A. absinthium* se realizó por hidrodestilación con equipo Clevenger para los tres quimiotipos. La hidrodestilación es una técnica de destilación por arrastre con vapor de agua en la que el material vegetal se halla en contacto con el agua hirviendo. La separación de los componentes más volátiles del material vegetal (que constituyen el aceite esencial) se basa en la aditividad de las presiones de vapor de líquidos inmiscibles, como lo son el agua y los compuestos que forman el aceite esencial. Dado que la ebullición tiene lugar cuando la presión de vapor es igual a la externa (en este caso la atmosférica), al calentar conjuntamente el agua y el material vegetal, los componentes volátiles de éste pueden pasar a estado de vapor a una temperatura notablemente inferior (en torno a la temperatura de ebullición del agua) a su temperatura de ebullición como sustancias puras. De este modo, el vapor generado contiene pequeñas cantidades de aceite esencial que al condensar, por su inmiscibilidad, quedan separadas de la fase acuosa (normalmente en la parte superior ya que suelen ser menos densos que el agua) (Barrow, 1972). El proceso termina cuando el volumen de aceite esencial acumulado no varía con el tiempo de extracción.

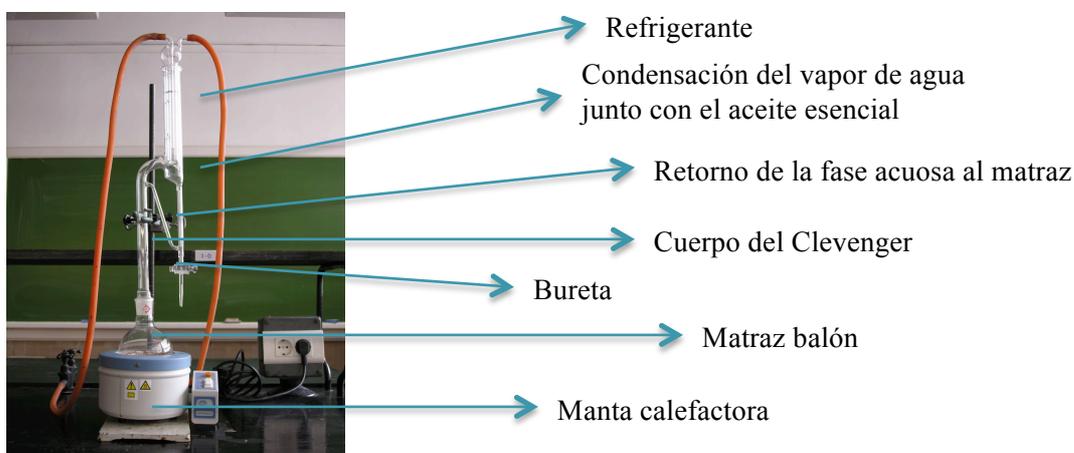


Figura 3. Equipo Clevenger.

### **3.2.3 METODOLOGÍA**

Para llevar a cabo la hidrodestilación se emplearon dos matraces balón donde se introdujeron 200 g del quimiotipo A, 240 g del quimiotipo B, 250 g del quimiotipo H y agua a razón de 10 mL de agua por cada gramo de material aproximadamente. Transcurridas tres horas se midió la cantidad de destilado total y el rendimiento de cada uno de los tres quimiotipos, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 2.

Una vez finalizada la destilación se recogió el aceite esencial en un vial, se añadió sulfato de sodio anhidro para deshidratar y se filtró depositándolo en otros tres viales de color topacio para proteger los aceites de la luz (uno por cada quimiotipo destilado), en congelación a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis cromatográfico y la determinación de la actividad antioxidante.

### 3.3 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

#### 3.3.1 MATERIALES

- CG/MS (columna apolar ZB-5) (PerkinElmer Inc. Wellesley, EEUU)
- Guantes (semperguard<sup>®</sup>)

**Reactivos:**

- Diclorometano (Scharlau, n° CAS: 75-09-2)

#### 3.3.2 FUNDAMENTO

La cromatografía de gases es un método físico de separación en el que los componentes de una mezcla, disueltos en una fase móvil gaseosa, se van desplazando con diferente velocidad a través de una fase estacionaria, produciéndose una separación de los diferentes componentes, de forma que puedan separarse y en cierta medida identificarse atendiendo a su particular velocidad de avance, dando lugar a una diferencia en los denominados “tiempos de retención”. No solo la fase móvil ha de ser un gas, también debe serlo la mezcla a separar; por ello, la cromatografía de gases requiere la volatilización previa de la muestra (García-Segura *et al.*, 1996). Según la naturaleza de la fase estacionaria y el programa de temperatura empleado, los distintos compuestos son retenidos en mayor o menor medida por la fase estacionaria de modo que salen de la columna y entran en el detector a diferentes tiempos, tal como ya se indicó anteriormente.

El detector utilizado puede ser de distintos tipos. Cuando el objetivo está más centrado en la cuantificación se emplea el detector de ionización de llama (FID). En este trabajo se ha utilizado, sin embargo, un detector por espectroscopía de masas, dado que la finalidad básica es la identificación de los componentes.

La espectrometría de masas es una técnica en la que los iones obtenidos de una sustancia (en general orgánica), se separan según su relación masa-carga iónica por impacto electrónico con un haz de electrones a 70 eV, dando lugar al espectro de masas característico de la citada sustancia. En la actualidad, la combinación directa cromatografía de gases-espectrometría de masas se reconoce como uno de los sistemas más eficaces para el estudio de mezclas complejas de productos orgánicos. Conectando la salida de un cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas se puede obtener información estructural para cada uno de los componentes de la mezcla original, a medida que estos son eluidos en serie en la columna cromatográfica (Dabrio *et al.*, 1973).

#### 3.3.3 METODOLOGÍA

Una vez extraídos los aceites de los tres quimiotipos, se prepararon las correspondientes disoluciones en diclorometano con una concentración de 10 µL/mL para proceder al análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS). La naturaleza de las fases móvil y estacionaria así como los parámetros de funcionamiento del equipo fueron los siguientes: columna apolar ZB-5 como sistema de separación (5% fenil –

95% dimetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex Inc., Torrance, EEUU). La fase móvil fue el gas Helio con un caudal de 1,2 mL/min. La temperatura del inyector de 250°C, mientras que la temperatura del horno se programó desde 50°C a 250°C a razón de 3°C/min (en el análisis de los extractos procedentes de las zonas con actividad antioxidante la temperatura del horno se programó desde 60°C, que se mantuvieron durante tres minutos, para aumentar a razón de 10°C/min hasta 180°C y a continuación a 20°C/min hasta los 280°C).

Una vez obtenidos los cromatogramas, para poder realizar una comparación más exhaustiva de los tres quimiotipos se llevó a cabo una determinación de la composición química de los aceites esenciales. Para ello, se compararon los espectros de masas de los picos de cada uno de los cromatogramas correspondientes a los tres quimiotipos estudiados, con los de las bases de datos Adams (2007) y NIST (2011). Asimismo, se calcularon, para cada uno de los programas de temperatura utilizados, los índices de retención de Kovats para cada pico, comparándose con los referidos en la bibliografía. Para calcular los índices de retención de Kovats (IR) de cada pico, es necesario determinar, en las mismas condiciones de trabajo, los tiempos de retención de la serie homóloga de los *n*-alcanos considerados, obteniendo el cromatograma correspondiente. A partir de dicho cromatograma, mediante una sencilla hoja de cálculo, se puede aplicar la fórmula del índice de Kovats que se muestra a continuación:

$$IK = 100 \times n + 100 \frac{(\log_{10} t_{Rx} - \log_{10} t_{Rn})}{(\log_{10} t_{RN} - \log_{10} t_{Rn})}$$

Donde:

*n* es el número de átomos de carbono del *n*-alcano que eluye antes del pico analizado.

$t_{Rx}$  es el tiempo de retención del pico analizado.

$t_{Rn}$  es el tiempo de retención del *n*-alcano anterior al pico analizado.

$t_{RN}$  es el tiempo de retención del *n*-alcano posterior al pico analizado.

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la determinación de las diferencias en actividad antioxidante de los aceites esenciales estudiados, se evaluó la capacidad de captación de radicales de los aceites usando el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) comparando el quimiotipo B (español) y el húngaro. Posteriormente se llevó a cabo un ensayo bioautográfico mediante cromatografía en capa fina (TLC) en combinación con GC/MS con objeto de detectar a qué compuestos puede atribuirse la actividad antioxidante observada.

#### 3.4.1 ENSAYO DPPH

##### 3.4.1.1 MATERIALES

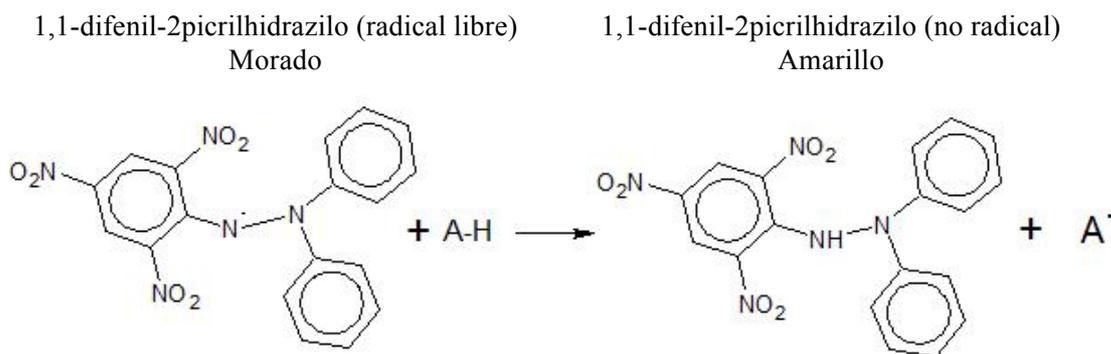
- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| -Espectrofotómetro (PerkinElmer)                   | -Erlenmeyer (NORMAX)                 |
| -Balanza analítica (Instrumentos científicos S.A.) | -Vaso de precipitados (PYREX)        |
| -Propipetas (LLG <sup>®</sup> LABWARE)             | -Gradilla (Kartell <sup>®</sup> )    |
| -Tubos de ensayo (PYREX <sup>®</sup> )             | -Pipeta Pasteur (VWR)                |
| -Espátula (SELECTA)                                | -Guantes (semperguard <sup>®</sup> ) |

##### Reactivos:

- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Sigma ALDRICH, n° CAS: 1898-66-4)
- Metanol (Scharlau, n° CAS: 67-56-1)
- Trolox (Santa Cruz Biotechnology, n° CAS: 53188-07-1)

##### 3.4.1.2 FUNDAMENTO

La capacidad de captación de radicales de los aceites se evaluó mediante el ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) propuesto por Blois (1958), en el cual se demostró por primera vez la capacidad del radical libre DPPH para aceptar un átomo de hidrógeno proveniente de una molécula de cisteína. El DPPH es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante, que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tovar del río, 2013).



**Figura 4.** Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.

Para expresar los resultados de actividad antioxidante se recurre a la realización de un ajuste de trolox (análogo hidrosoluble del  $\alpha$ -Tocoferol) que debido a su alta solubilidad en agua y su amplia disponibilidad comercial, es universalmente empleado como estándar en diversos ensayos de actividad antioxidante. Los resultados se interpolan en una curva de calibración de trolox y se expresan como equivalentes de trolox, es decir, en  $\mu\text{mol}$  de trolox necesarios para proporcionar la misma capacidad antioxidante que un gramo de la muestra. Cuanto más alto sea el valor equivalente de trolox, más antioxidante es la muestra (Pérez-Jiménez, 2007).

### 3.4.1.3 METODOLOGÍA

Para determinar la actividad antioxidante de los dos quimiotipos de *A. absinthium* seleccionados (QTB y QTH), se utilizó un método basado en el descrito por Brand-Williams (1995). Para ello se utilizaron distintas concentraciones de aceite esencial (realizando cada ensayo por triplicado), añadiendo siempre el mismo volumen de DPPH (950  $\mu\text{L}$ ) y compensando con metanol hasta 3000  $\mu\text{L}$ . Paralelamente se llevó a cabo un ajuste de trolox, realizado también a diferentes concentraciones, añadiendo en este caso un volumen de 1750  $\mu\text{L}$  de DPPH y completando con metanol hasta 3500  $\mu\text{L}$ . Para que la disolución de DPPH reaccionara con el sustrato antioxidante se colocaron los tubos de ensayo al abrigo de la luz durante 30 minutos y a temperatura ambiente, permitiendo que tuviera lugar la reacción. Posteriormente se realizó una lectura de las absorbancias a 517 nm con un espectrofotómetro. Una disminución en la absorbancia de la disolución de DPPH indica un aumento de la actividad de captación de radicales DPPH. Los valores se calcularon como porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

Donde:

Absorbancia del blanco es la medida de la absorbancia del espectrofotómetro a 517 nm para la disolución de DPPH en metanol sin muestra. El ajuste inicial a cero se realizó con metanol puro.

### 3.4.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

#### 3.4.2.1 MATERIALES

- Vitrina de gases
- Estufa (J.P. SELECTA, s.a.)
- Guantes (semperguard®)
- Pulverizador comercial
- Lámpara ultravioleta (Vilber Lourmat 254 y 365 nm)
- Cromatofolios (DC-Fertigfolien Alugram Sil G/UV, Indicador fluorescencia de UV 254)
- Capilares (Blaubrand intraMark, 25 µL)
- Viales cromatográficos de inserto
- Cubeta de vidrio cromatográfica

#### Reactivos:

- Vainillina-ácido sulfúrico (Panreac): 1% de vainillina en etanol 96% (disolución 1) y 10% de ácido sulfúrico en etanol (disolución 2)
- Anisaldehído-ácido sulfúrico. El reactivo fue preparado del modo siguiente: a 0,5 mL de anisaldehído se le añadieron 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado en este orden.
- DPPH Sigma-Aldrich (2 mM en metanol HPLC) marca
- Eluyente: Tolueno:acetato de etilo (93:7)
- Diclorometano (Scharlau, n° CAS: 75-09-2)

#### 3.4.2.2 FUNDAMENTO

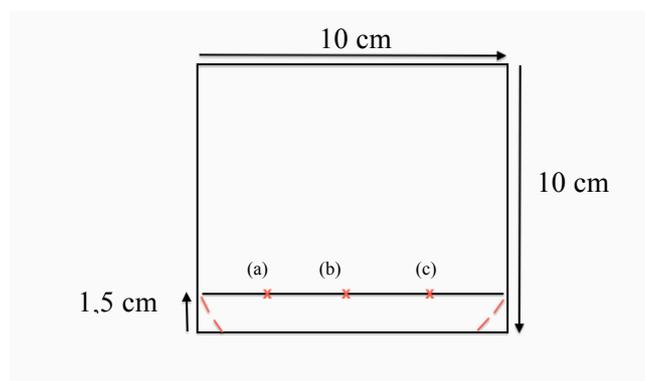
TLC (Thin Layer Chromatography) o cromatografía en capa fina es un método físico de separación basado en hacer avanzar, por capilaridad, una fase móvil sobre una fase estacionaria plana, de forma que los solutos de la muestra aplicada se separen de acuerdo con su afinidad relativa por cada una de ambas fases caracterizadas por su polaridad. De este modo, los componentes de la muestra quedan separados según su diferente  $R_f$  (factor de retención), donde:

$$R_f = \frac{\text{distancia avanzada por un soluto}}{\text{distancia avanzada por el frente del eluyente}}$$

El soporte de la fase estacionaria es un sólido pulverizado (gel de sílice, en este trabajo), el cual se encuentra extendido en forma de una capa fina (0,15-0,5 mm de espesor) sobre una plancha de vidrio, plástico o metal (García-Segura *et al.*, 1996). En este trabajo se utilizaron cromatofolios en los que la capa de gel de sílice se halla depositada sobre una lámina flexible de aluminio.

#### 3.4.2.3 METODOLOGÍA

Para determinar las bandas de actividad antioxidante de los tres quimiotipos de *A. absinthium* se realizó una dilución de los aceites en diclorometano (10 µL en 1 mL). Se trabajó con los tres quimiotipos en las mismas condiciones, para ello se recortaron los cromatofolios en 3 láminas de 10 x 10 cm como las que se muestran en la siguiente figura (figura 5).



**Figura 5.** Prototipo de las medidas de las capas finas empleadas para determinar las bandas de actividad antioxidante de los tres quimiotipos de *A. absinthium*.

- (a) QT A
- (b) QT B
- (c) QT H

Sobre cada una de las cruces en rojo (figura 5) de la capa fina se aplicaron entre 5 y 10  $\mu\text{L}$  del quimiotipo correspondiente con ayuda de un capilar y se llevó a una cubeta de vidrio con tolueno:acetato de etilo (93:7) como eluyente. Tras dejar pasar entre 15 y 20 minutos, cuando el frente del eluyente llegó aproximadamente a 1,5-2 cm del extremo superior de los cromatofolios, estos se extrajeron y se marcaron los frentes de eluyente. También se anotó por debajo de la línea inferior de 1,5 cm el tipo de revelado que se aplicaría posteriormente en cada capa y se depositaron en una bandeja, dentro de la vitrina de gases hasta que estuvieron completamente secas. La elución de los tres quimiotipos en contacto con diferentes agentes reveladores permitió separar los componentes de cada aceite esencial, llevando a cabo una primera valoración de su complejidad, así como la determinación de las zonas correspondientes a los compuestos de mayor actividad antioxidante. En primer lugar se trabajó con la vainillina, para ello se pulverizó el reactivo A (vainillina en etanol -1%-), seguido inmediatamente del B (ácido sulfúrico en etanol -10 %-) y se introdujo en estufa (105-110°C) durante 3 minutos. En segundo lugar se pulverizó sobre la capa fina el anisaldehído sulfúrico, se introdujo en estufa (105-110°C) y a los 3 minutos se observó con ayuda de una lámpara ultravioleta ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ). Por último se realizó una pulverización simple con DPPH 2 mM en metanol (color violeta), cuya decoloración permitió determinar las zonas con mayor presencia de compuestos antioxidantes, aplicando de este modo el método bioautográfico descrito por autores como Mimica-Dukić *et al.*, (2002) y Choma y Grzelak, (2010).

Posteriormente se llevó a cabo la cromatografía en capa fina preparativa para obtener los extractos de cada una de las zonas de fase estacionaria (gel de sílice) correspondientes a las zonas de mayor actividad antioxidante. Para ello se prepararon dos cromatofolios (uno para el QTB y otro para el QTH) y se desarrollaron de modo absolutamente análogo al empleado al aplicar el DPPH. Una vez extraídos de la cubeta se marcó el frente del eluyente y se dejaron secar en la vitrina de gases, según el método de trabajo habitual. Una vez desecados, se marcó la posición de las bandas con actividad antioxidante, a partir de los rangos de  $R_f$  calculados a partir del cromatofolio revelado con DPPH (figura 16). De este modo, tomando como referencia la figura 16, se determinaron los rangos de  $R_f$

correspondientes (para cada quimiotipo) a las zonas de mayor actividad antioxidante y se rascaron las bandas (figuras 17 y 23) introduciendo la fase estacionaria correspondiente en viales con 1 mL de diclorometano. Tras agitación por un periodo de 15 minutos, los extractos obtenidos por filtración se introdujeron en nuevos viales, dejando evaporar el diclorometano hasta un volumen aproximado de 200  $\mu$ L. Dichos volúmenes fueron trasladados a viales cromatográficos de inserto, conservados a 4°C hasta el análisis por GC/MS para conocer los compuestos con actividad antioxidante correspondientes a cada banda del cromatofolio analizada.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

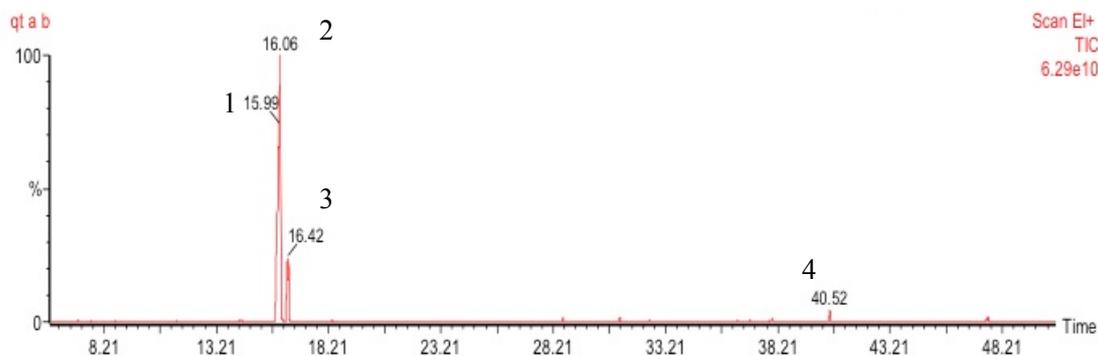
De los tres quimiotipos destilados, los españoles (concretamente el quimiotipo A) registraron mayor rendimiento que el quimiotipo húngaro como se muestra en la tabla 2. Ello obligó a realizar cuatro destilaciones del quimiotipo procedente de Hungría en lugar de las dos realizadas para cada uno de los quimiotipos españoles.

**Tabla 2.** Cantidad destilada y rendimiento de la destilación de los tres quimiotipos de *A. absinthium*.

	QTA	QTB	QTH
Destilado (mL)	2,7	2,90	0,93
Rendimiento (%)	1,371±0,113	1,2±0,0	0,38±0,13

### 4.2 COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

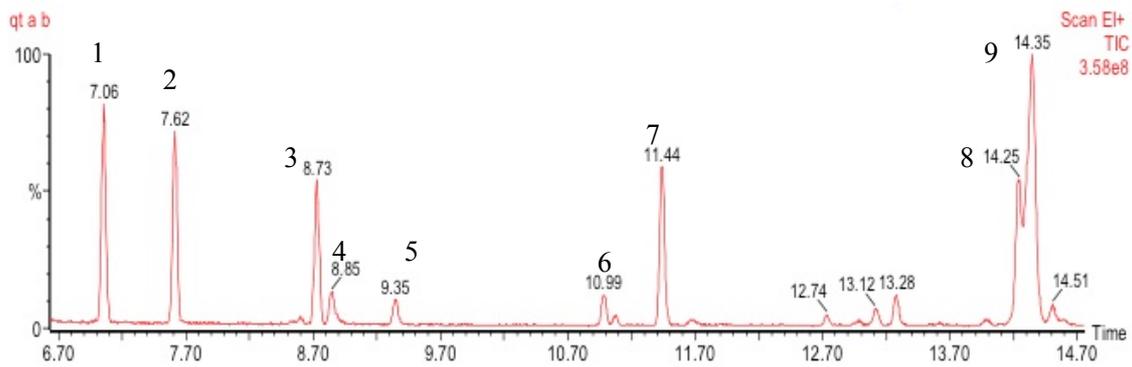
A continuación se muestran una serie de figuras que corresponden a los cromatogramas obtenidos de los tres quimiotipos de *A. absinthium* donde se pueden observar los componentes mayoritarios de cada uno de los tres quimiotipos.



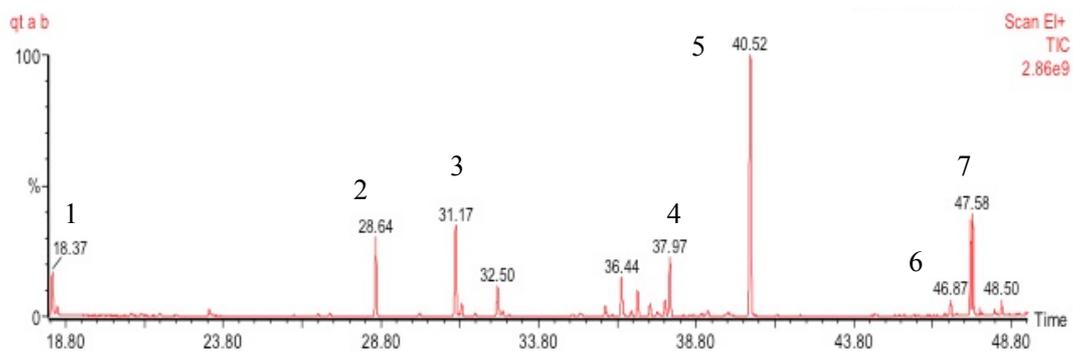
**Figura 6.** GC/MS cromatograma completo correspondiente al quimiotipo A con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) (*E*)- $\beta$ -epoxiocimeno, (2) (*Z*)- $\beta$ -epoxiocimeno, (3) Alcanfor, (4) Camazuleno.

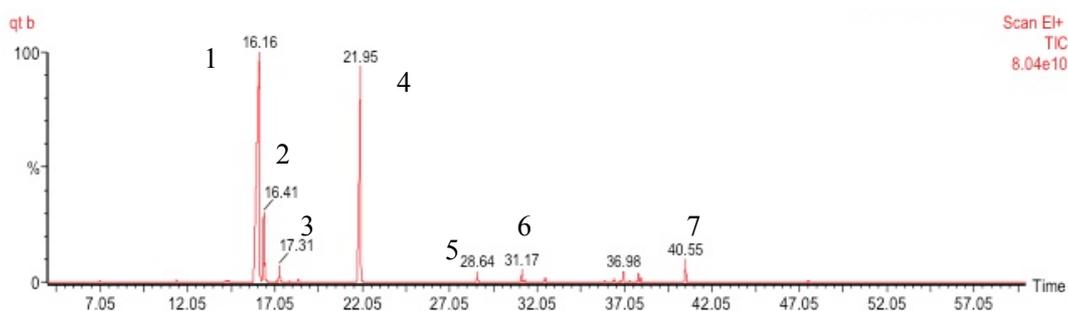
Debido a que, en el caso concreto del quimiotipo A, existe aparentemente una gran diferencia entre la abundancia de los cuatro componentes mayoritarios y el resto de componentes del aceite esencial, el pico mayoritario mostrado en la figura 6 resta visibilidad al resto. Por ello, se muestran también dos cromatogramas obtenidos a partir de una ampliación de dicha figura, donde se detallan el resto de componentes que se encuentran en el aceite esencial en menores cantidades.



**Figura 7.** GC/MS cromatograma parcial correspondiente al quimiotipo A con la identificación de los componentes mayoritarios en un intervalo de tiempo de retención entre 6,70 y 16,70.  
 (1)  $\alpha$ -Pinoeno, (2) Canfeno, (3) Alcanfor, (4) 1-Octen-3-ol, (5) Mirceno, (6) Limoneno, (7) (*Z*)- $\beta$ -Ocimeno, (8) Linalool, (9)  $\alpha$ -Tuyona.

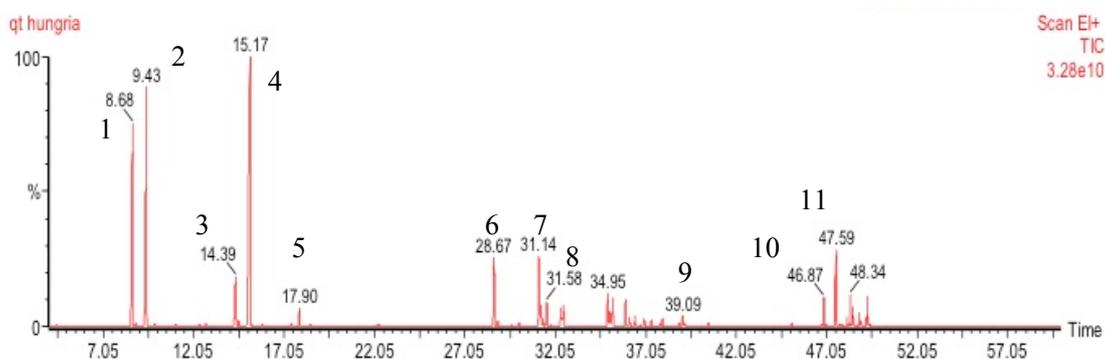


**Figura 8.** GC/MS cromatograma parcial correspondiente al quimiotipo A con la identificación de los componentes mayoritarios en un intervalo de tiempo de retención entre 18,80 y 48,80.  
 (1)  $\alpha$ -Terpineol, (2)  $\beta$ -Cariofileno, (3) (*Z*)-muuro-la-4(14),5-dieno, (4)  $\alpha$ -Eudesmol, (5) Camazuleno, (6) Geranyl-*p*-cimeno, (7) Isobutanoato de (*E*)-nuciferilo.



**Figura 9.** GC/MS cromatograma completo correspondiente al quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios.  
 (1) (*Z*)- $\beta$ -epoxiocimeno, (2) (*E*)- $\beta$ -epoxiocimeno, (3) Alcanfor, (4) (*Z*)-Acetato de crisantemilo, (5)  $\beta$ -Cariofileno, (6) (*E*)-Cadina-1-(6),4-dieno, (7) Camazuleno.

A falta de presentar el cromatograma del quimiotipo de Hungría se pueden apreciar similitudes entre los componentes mayoritarios de ambos quimiotipos españoles (QTA y QTB). A excepción del (Z)-acetato de crisantemilo que está en mucha mayor proporción en el quimiotipo B que en el A. Ambos quimiotipos poseen como componentes mayoritarios el (E)- $\beta$ -epoxiocimeno, (Z)- $\beta$ -epoxiocimeno, alcanfor y camazuleno.



**Figura 10.** GC/MS cromatograma completo correspondiente al quimiotipo húngaro con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Sabineno, (2) Mirceno, (3) Linalool, (4)  $\beta$ -Tuyona, (5) Terpinen-4-ol, (6)  $\beta$ -Cariofileno, (7)  $\gamma$ -Gurjuneno, (8) Isobutanoato de nerilo, (9)  $\alpha$ -Bisabolol, (10) Geranyl-*p*-cimeno, (11) Isobutanoato de (E)-nuciferilo.

A continuación se muestran en la tabla 3 los compuestos identificados donde se realiza una estimación de la proporción relativa de los compuestos presentes en cada quimiotipo de aceite. La composición porcentual de aceite esencial de cada quimiotipo, se calcula a partir de las áreas de pico de los cromatogramas, mediante el programa TURBOMASS (5.00) (PerkinElmer<sup>TM</sup>).

**Tabla 3.** Composición química de las partes aéreas de los tres quimiotipos de *A. absinthium*

<sup>a</sup>Tanto por cien con respecto al área total de los picos del cromatograma obtenido mediante GC/MS

<sup>b</sup>Compuestos en orden de elución en la columna cromatográfica ZB-5

<sup>c</sup>Índice de retención de Kovats experimental

<sup>d</sup>Índice de retención de Kovats de la bibliografía, obtenidos de Adams (2007), excepto los expresamente indicados

<sup>e</sup>Trazas (%<0,1)

<sup>f</sup>No detectado

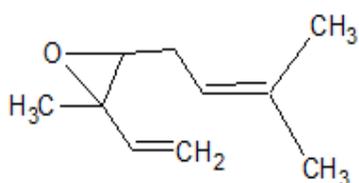
<sup>g</sup>Judzentiene *et al.* (2009)

<sup>h</sup><sup>i</sup>Llorens-Molina *et al.* (2016)

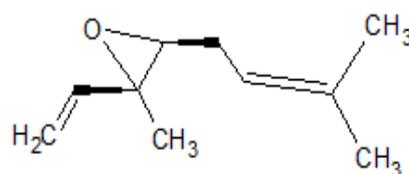
Nombre del compuesto <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	IR (lit) <sup>d</sup>	% <sup>(a)</sup>		
			QTA	QTB	QTH
$\alpha$ -Pino	937	939	0,1	0,1	tr <sup>e</sup>
Canfeno	952	954	0,1	tr	- <sup>f</sup>
Sabineno	976	975	-	tr	13,8
$\beta$ -Pino	978	979	0,1	tr	-
1-Octen-3-ol	981	979	tr	tr	0,1

<b>Mirceno</b>	992	990	tr	0,1	16,6
<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	1003	1002	-	-	0,1
<b>Limoneno</b>	1030	1029	tr	tr	-
<b>(Z)-<math>\beta</math>-Ocimeno</b>	1041	1037	0,2	-	-
<b>(E)-<math>\beta</math>-Ocimeno</b>	1043	1050	tr	0,3	-
<b>Epóxido de <math>\alpha</math>-pineno</b>	1097	1099	-	0,2	-
<b>Linalool</b>	1099	1096	0,2	0,2	4,2
<b>Nonanal</b>	1103	1100	tr	-	-
<b><math>\alpha</math>-Tuyona</b>	1102	1102	0,2	-	0,3
<b><math>\beta</math>-Tuyona</b>	1116	1114	0,1	0,1	28,0
<b>(Z)-<math>\beta</math>-Epoxiocimeno</b>	1139	1132	61,9	36,0	0,1
<b>(E)-<math>\beta</math>-Epoxiocimeno</b>	1148	1142	10,7	10,4	-
<b>Alcanfor</b>	1150	1146	5,1	2,4	-
<b>(Z)-Crisantemol</b>	1167	1164	0,2	-	0,1
<b>Borneol</b>	1171	1169	0,3	-	-
<b>Terpinen-4-ol</b>	1177	1177	0,4	0,1	0,9
<b>Butanoato 3-(Z)-hexenilo</b>	1186	1186	-	0,4	-
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	1189	1188	0,1	0,1	0,1
<b>(Z)-Geraniol</b>	1241	1229	0,1	-	-
<b>(E)-Acetato de crisantemilo</b>	1245	1238	tr	-	-
<b>(Z)-Acetato de crisantemilo</b>	1261	1265	0,1	35,4	-
<b>Acetato de bornilo</b>	1283	1288	-	tr	-
<b>Acetato de nerilo</b>	1363	1361	-	-	tr
<b>Eugenol</b>	1356	1359	0,1	0,1	-
<b><math>\alpha</math>-Copaeno</b>	1374	1376	0,1	0,1	-
<b><math>\beta</math>-Bourboneno</b>	1382	1388	0,1	0,1	-
<b>(Z)-Jasmona</b>	1394	1392	tr	tr	-
<b><math>\beta</math>-Cariofileno</b>	1416	1419	1,8	1,6	4,2
<b>Isobutanoato de lavandulilo</b>	1421	1422	-	-	0,3
<b><math>\beta</math>-Copaeno</b>	1426	1432	tr	-	-
<b>(Z)-<math>\beta</math>-Farneseno</b>	1441	1442	-	-	tr
<b><math>\alpha</math>-Humuleno</b>	1451	1454	0,1	0,1	0,1
<b>(Z)-Muuro-la-4,14,5-dieno</b>	1478	1466	2,3	-	-
<b>(E)-Cadina-1-(6),4-dieno</b>	1478	1476	-	1,93	-
<b><math>\gamma</math>-Gurjuneno</b>	1477	1477	-	-	5,2
<b><math>\alpha</math>-Curcumeno</b>	1480	1480	-	-	1,0
<b><math>\gamma</math>-Himachaleno</b>	1483	1482	-	-	0,4
<b>Germacreno-D</b>	1482	1485	0,2	0,1	-
<b><math>\beta</math>-Selineno</b>	1482	1490	-	0,4	-
<b>Isobutanoato de nerilo</b>	1487	1491	-	-	1,4
<b>Valenceno</b>	1492	1496	-	0,04	-
<b><math>\alpha</math>-Selineno</b>	1493	1498	0,1	-	-
<b>Isovalerato de lavandulilo</b>	1506	1509	-	-	1,4
<b>Isobutanoato de geraniol</b>	1510	1515	-	-	1,5
<b>Himachaleno&lt;<math>\alpha</math>-dehidro-ar&gt;</b>	1514	1517	-	0,08	-
<b><math>\delta</math>-Cadineno</b>	1520	1522	tr	-	-
<b>Hidrato de (E)-Sesquisabineno</b>	1576	1579	-	0,1	0,5
<b>Isovalerato de nerilo</b>	1580	1583	-	-	1,7

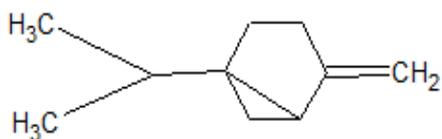
<b>Óxido de cariofileno</b>	1598	1583	0,3	0,1	-
<b>Isovalerato de geranilo</b>	1609	1607	-	tr	tr
<b>Epóxido de <math>\beta</math>-Cedreno</b>	1621	1622	-	0,1	-
<b>(Z)-Jasmonato de metilo</b>	1644	1649	0,2	-	-
<b><math>\beta</math>-Eudesmol</b>	1652	1650	-	-	0,1
<b><math>\alpha</math>-Eudesmol</b>	1655	1653	1,2	-	-
<b>Valerato de geranilo</b>	1654	1656	0,5	-	0,4
<b><math>\alpha</math>-Bisabolol</b>	1686	1685	0,1	-	0,6
<b>Camazuleno</b>	1725	1731	4,0	3,7	0,2
<b>Geranyl-<i>p</i>-cimeno</b>	1953 <sup>g</sup>	1950	0,4	-	1,6
<b>Isobutanoato de (Z)-nuciferilo</b>	1998 <sup>h</sup>	1997	1,6	-	2,2
<b>Isobutanoato de (E)-nuciferilo</b>	2006 <sup>i</sup>	2004	1,2	-	3,3
<b>Fitol</b>	2104	2106	-	-	0,6
<b>Total compuestos identificados</b>			93,8	94,3	90,9



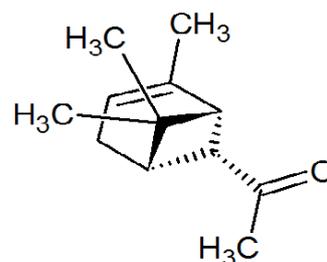
(Z)- $\beta$ -epoxiocimeno



(E)- $\beta$ -epoxiocimeno

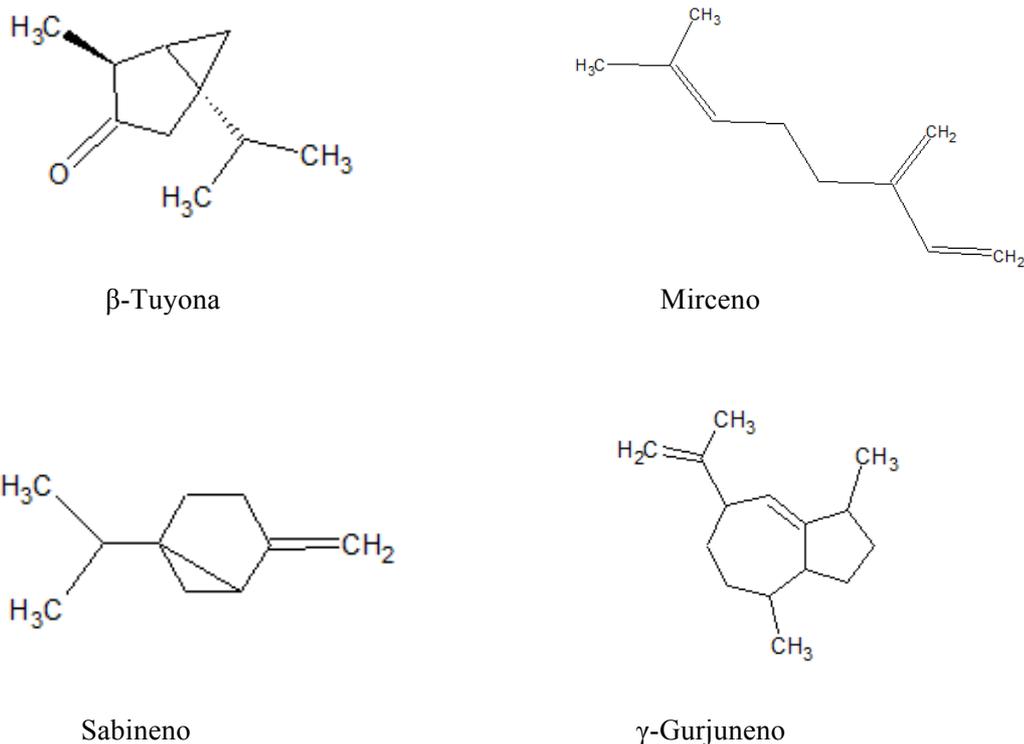


Alcanfor



(Z)-Acetato de crisantemilo

**Figura 11.** Estructuras químicas de los cuatro componentes mayoritarios de los quimiotipos A y B (españoles) de *A. absinthium*.



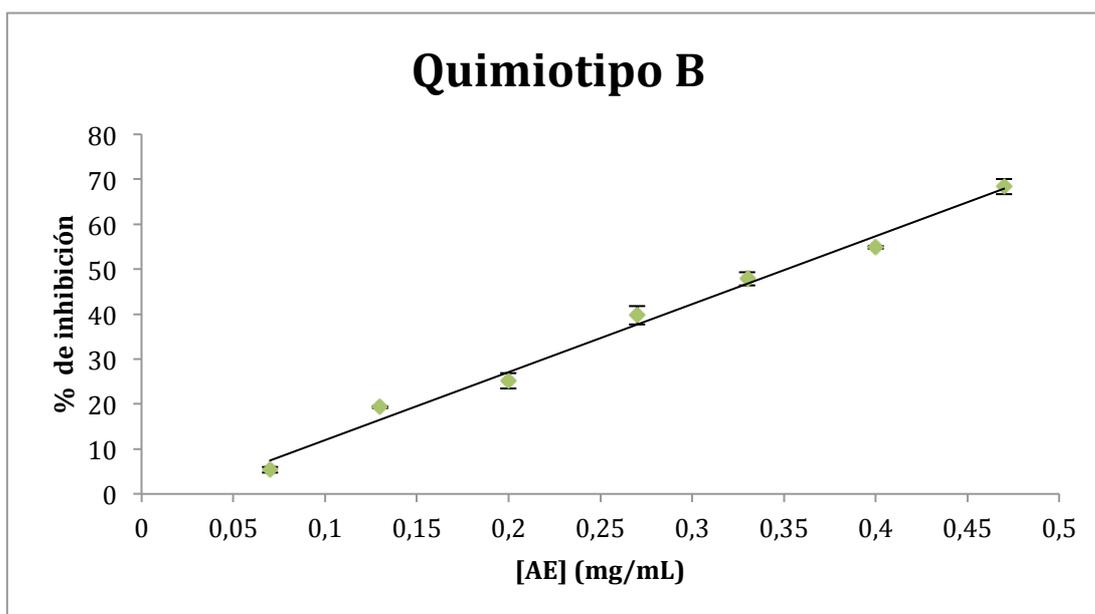
**Figura 12.** Estructuras químicas de los cuatro componentes mayoritarios del quimiotipo H (húngaro) de *A. absinthium*.

Finalmente se lograron identificar unos porcentajes superiores al 90% en los tres quimiotipos (93,80% del QTA, 94,25% del QTB y un 90,91% del QTH). Se encontraron un total de 66 compuestos entre los tres quimiotipos en un tiempo de retención desde 7 hasta 49 minutos. Los resultados de los quimiotipos españoles A y B (QTA y QTB) mostraron un alto contenido en (*Z*)-epoxiocimeno (61,9% en el quimiotipo A y 36,03% en el B), (*E*)-epoxiocimeno (10,72% en el QTA y 10,43% en el QTB) y alcanfor (5,10% en el QTA y 2,4% en el QTB) y una elevada cantidad de β-tuyona (27,97%), sabineno (13,79%), mirceno (16,60%) y γ-gurjuneno (5,20%) en el quimiotipo húngaro (QTH). Debe subrayarse la similitud entre los quimiotipos A y B que comparten tres de los cuatro componentes mayoritarios, que poseen, existiendo ligeras variaciones en cuanto a los porcentajes de los mismos. Un punto clave a señalar radica en que ambos quimiotipos españoles poseen como componente mayoritario (>35%) el compuesto (*Z*)-epoxiocimeno, que concuerda con investigaciones anteriores de *A. absinthium* (Llorens-Molina y Vacas, 2015 y Llorens-Molina *et al.*, 2016). Así como la composición de los quimiotipos españoles A y B alcanzó porcentajes de identificación de más del 70% teniendo en cuenta únicamente sus dos componentes mayoritarios, la composición del quimiotipo húngaro mostró una mayor variabilidad en cuanto a sus componentes principales. Se pueden encontrar numerosos estudios que reafirman la presencia de los componentes sabineno y mirceno en *A. Absinthium* (Baykan Erel *et al.*, 2012) así como la de sabineno y β-tuyona en el mismo individuo (Zanousi *et al.*, 2012 y Lopes-Lutz *et al.*, 2008) como componentes mayoritarios en cantidades superiores al 10%. Un claro rasgo diferencial entre la composición de los quimiotipos españoles y el quimiotipo húngaro es la proporción de los dos isómeros de

epoxiocimeno que, como ya se ha mencionado anteriormente suponen más del 60% de la composición de los quimiotipos españoles y sin embargo, en el quimiotipo húngaro (que presenta exclusivamente el isómero (Z)-β-epoxiocimeno), únicamente implica un 0,1% de la composición total. Finalmente cabría añadir que la β-tuyona (compuesto neurotóxico) está mínimamente presente en los quimiotipos españoles, pero supone un 27,97% en la composición de las plantas del quimiotipo húngaro por lo que su utilización en alimentos y bebidas quedaría muy limitada. Dado que el quimiotipo B, relevante por su carencia de tuyonas, es el más representativo del este de la Península Ibérica (Ariño, 1999) y que su composición incluye la del quimiotipo A, más el citado acetato de crisantemilo, se utilizó para los posteriores ensayos de actividad antioxidante.

#### 4.3 ENSAYO DPPH

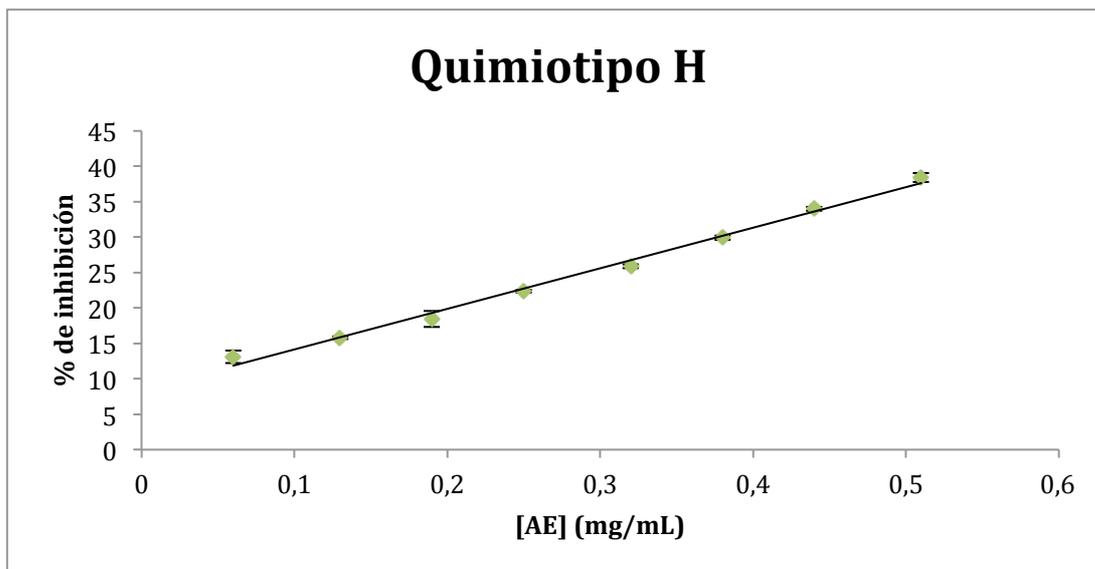
Se muestran en primer lugar las gráficas correspondientes a los ensayos de DPPH de los dos quimiotipos seleccionados (QTB y QTH) con sus respectivas barras de error estándar y la ecuación de la recta lineal.



**Figura 13.** Porcentaje de captación del radical DPPH frente a la concentración del aceite esencial del quimiotipo B.

#### ECUACIÓN QUIMIOTIPO B:

$$\% \text{ inhibición} = 151,22 [\text{AE}] - 3,149$$



**Figura 14.** Porcentaje de captación del radical DPPH frente a la concentración del aceite esencial del quimiotipo H.

#### ECUACIÓN QUIMIOTIPO H:

$$\% \text{ inhibición} = 57,274 [\text{AE}] - 8,4239$$

A simple vista se observa como los errores, obtenidos a partir de la repetición (por triplicado) de las muestras son muy bajos. Calculando la raíz cuadrada de  $R^2$  se obtiene el coeficiente de correlación de Pearson que mide el grado de asociación lineal entre dos variables. El valor de dicho coeficiente es 0,995 para el QTB y 0,996 para el QTH por lo que indica una correlación positiva muy fuerte entre las dos variables analizadas (concentración de aceite esencial y porcentaje de captación de radical DPPH en este caso).

Los resultados del ensayo DPPH se han presentado como el valor de la concentración máxima de la media inhibitoria (IC<sub>50</sub>), definido como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. Esta cifra se calcula graficando el porcentaje de inhibición frente a la concentración del extracto e igualando la ecuación de la recta obtenida al 50% (Tovar del río, 2013). De este modo, se obtienen para el quimiotipo español y para el quimiotipo húngaro unos valores de IC<sub>50</sub> de 0,35 mg/mL y 0,73 mg/mL respectivamente. Puesto que los datos facilitados en la bibliografía para *A. absinthium* (Kordali *et al.*, 2005) procedente de Turquía (cuyos compuestos mayoritarios son el camazuleno, óxido de cariofileno, nuciferol propionate y nuciferol butanoate) se facilitan en [AE] necesaria para realizar un 35% de inhibición (0,4 mg/mL), se iguala la ecuación de la recta de ambos quimiotipos al valor del 35% y se procede a comparar los resultados. En este caso, la [AE] necesaria para lograr un 35% de inhibición es inferior en el quimiotipo B (0,252 mg/mL) y ligeramente superior en el quimiotipo H (0,464 mg/mL). Los resultados obtenidos también son equiparables a los de otras artemisias como *Artemisia scoparia* (que presenta una elevada proporción de citronelal,

$\beta$ -citronelol, óxido de cariofileno y acenafteno) cuyo IC50 es de 0,15 mg/mL (Pal *et al.*, 2009) y son cifras mucho mayores que el IC50 del ajuste de Trolox llevado a cabo en el presente trabajo (0,03 mg/mL). En este caso, el cálculo realizado muestra que el quimiotipo B (español) posee mayor actividad antioxidante que el quimiotipo H (húngaro) puesto que requiere menor concentración (aproximadamente la mitad) de aceite esencial para alcanzar un porcentaje de inhibición del 50%. En otras publicaciones anteriores de actividad antioxidante (Politeo *et al.*, 2007) se registraron valores de IC50 de 1,38 mg/mL (menores a los obtenidos en este trabajo), por ejemplo, en *Ocimum basilicum* L. cuyos compuestos principales son linalool, estragol, (*E*)-metilcinamato y eugenol.

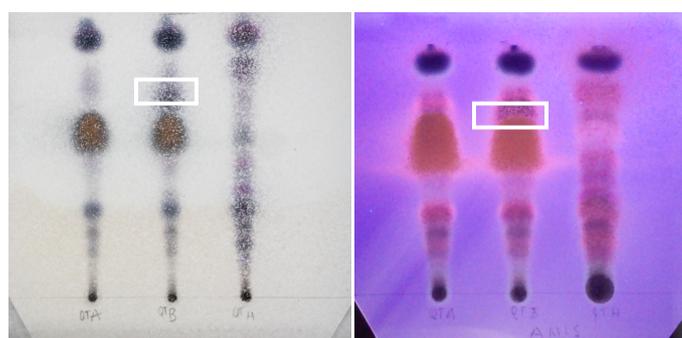
El IC50 puede convertirse en Equivalentes Trolox (TEAC por sus siglas en inglés Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) de acuerdo con la siguiente fórmula (Granados *et al.*, 2014):

$$TEAC = \frac{IC50 \text{ del Trolox } (\mu\text{mol}/\text{mL})}{IC50 \text{ de la muestra } (\text{g}/\text{mL})}$$

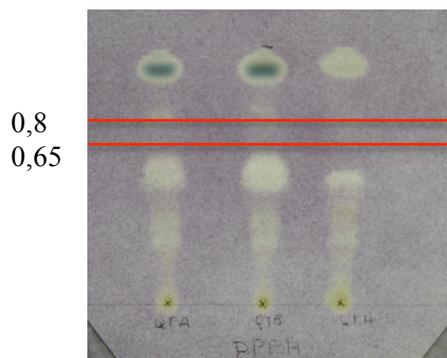
De este modo, se obtienen unos valores TEAC de 396,36  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g sustancia evaluada para el quimiotipo B y de 191,91  $\mu\text{mol}/\text{g}$  en el caso del quimiotipo H. Las cifras obtenidas pueden compararse con las alcanzadas por otros aceites esenciales de la bibliografía como es el caso del aceite esencial (procedente de las hojas) de *Myrcianthes leucoxylla* cuyo valor de TEAC es de 121,09  $\mu\text{mol}$  de trolox/g de extracto, el cual es menor que el reportado para el orégano, una especie de referencia con conocida capacidad antioxidante (Granados *et al.*, 2014) y que también es menor a los valores de TEAC obtenidos para los dos aceites esenciales estudiados en el presente trabajo.

#### 4.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

A continuación se muestran dos figuras (15 y 16) correspondientes a los cromatofolios con los tres quimiotipos de *A. absinthium* y los tres reveladores pulverizados.



**Figura 15.** Cromatografía en capa fina de las bandas correspondientes a los compuestos mayoritarios de los tres quimiotipos de *A. absinthium* pulverizados con vainillina (izquierda) y anisaldehído (derecha), observada mediante radiación ultravioleta ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ).

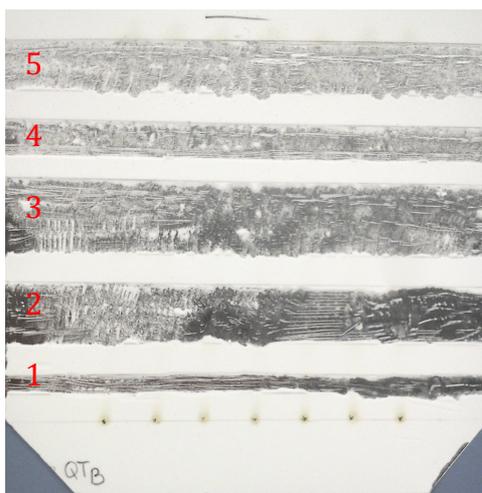


**Figura 16.** Cromatografía en capa fina de las bandas de actividad antioxidante de los tres quimiotipos de *A. absinthium* pulverizados con DPPH.

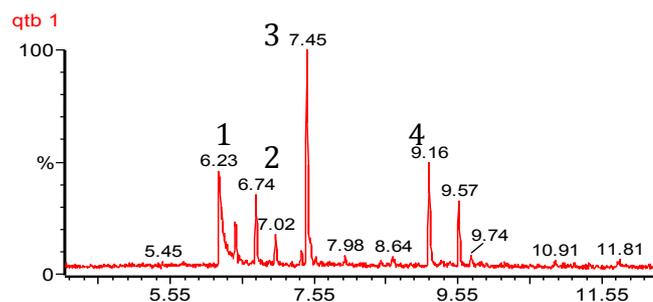
Como puede observarse en la figura 15, los perfiles cromatográficos de los quimiotipos A y B son prácticamente similares, a excepción de la zona correspondiente a los valores de  $R_f$  comprendidos entre 0,65 y 0,8. Tal como se comprueba posteriormente al analizar las muestras mediante GC/MS, ambos quimiotipos tienen una composición similar a excepción de la presencia de acetato de crisantemilo, en una proporción relativamente importante, en el quimiotipo B.

Al mismo tiempo, cuando se compara la cromatografía en capa fina de los tres quimiotipos de *A. absinthium* pulverizados con DPPH (figura 16) se observa una clara coincidencia entre las manchas correspondientes a los compuestos mayoritarios y las zonas de mayor decoloración (máxima actividad antioxidante).

La realización de la cromatografía preparativa en combinación con GC/MS permitió, mediante el raspado de las bandas con actividad antioxidante, identificar los compuestos pertenecientes a dichas bandas, es decir, aquellos compuestos que determinan la actividad antioxidante del aceite esencial.

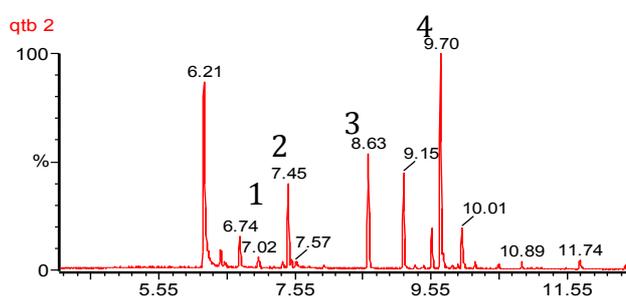


**Figura 17.** Bandas con actividad antioxidante del quimiotipo B, en las que la fase estacionaria fue separada y su extracto en diclorometano analizado por GC/MS para la determinación de sus componentes.



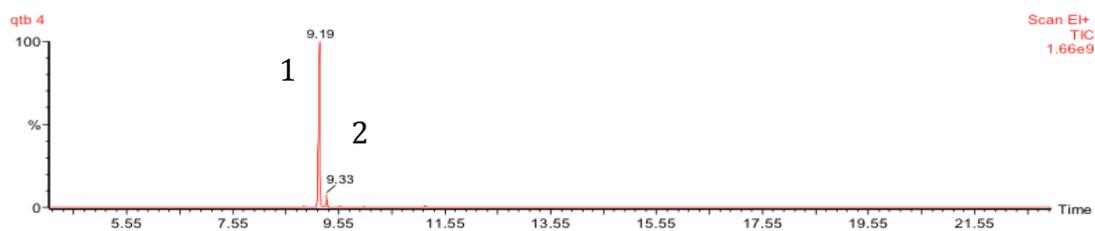
**Figura 18.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 1 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Sabineno, (2) Mirceno, (3) Limoneno, (4) (*Z*)- $\beta$ -Epoxiocimeno



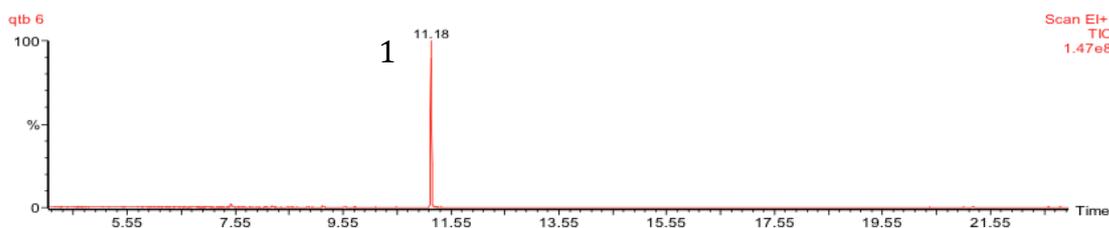
**Figura 19.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 2 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Mirceno, (2) Limoneno, (3) Linalool, (4) (*Z*)- $\beta$ -Epoxiocimeno



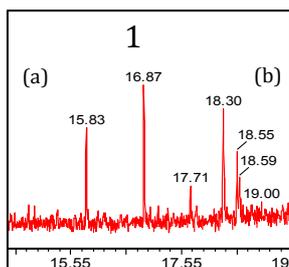
**Figura 20.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 3 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) (*Z*)- $\beta$ -Epoxiocimeno, (2) (*E*)- $\beta$ -Epoxiocimeno



**Figura 21.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 4 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Acetato de crisantemilo

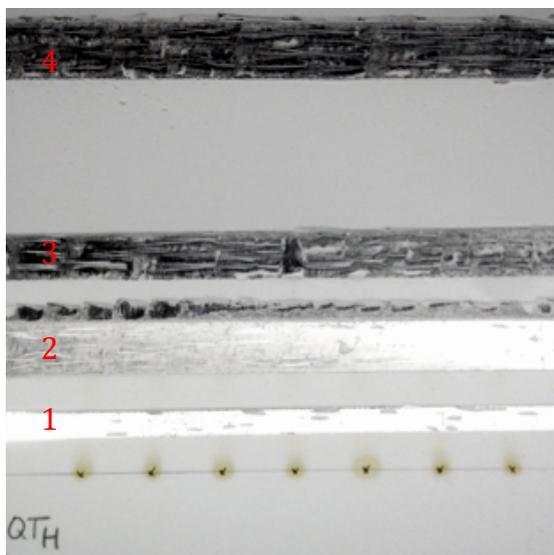


**Figura 22.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 5 del quimiotipo B con la identificación de los componentes mayoritarios.

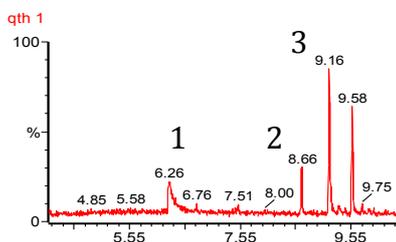
(1) Camazuleno

(a) Zonas del cromatograma que proporcionan ruido (excluidas)

(b) Componentes procedentes de plastificantes y sangrado de la columna

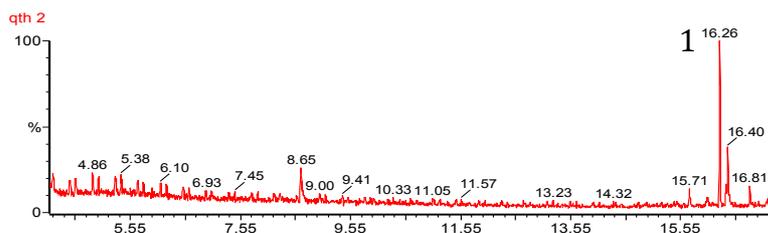


**Figura 23.** Bandas con actividad antioxidante del quimiotipo H, en las que la fase estacionaria fue separada y su extracto en diclorometano analizado por GC/MS para la determinación de sus componentes.



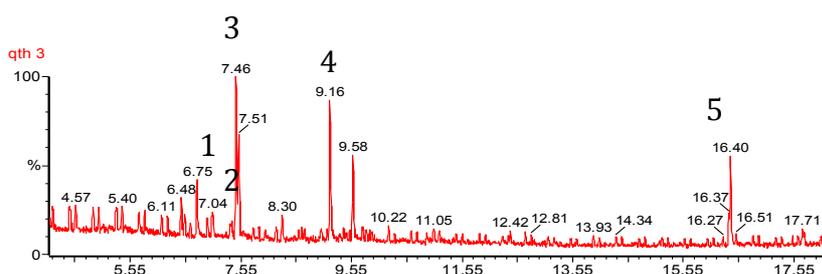
**Figura 24.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 1 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Sabineno, (2) Linalool, (3) (Z)- $\beta$ -Epoxiocimeno



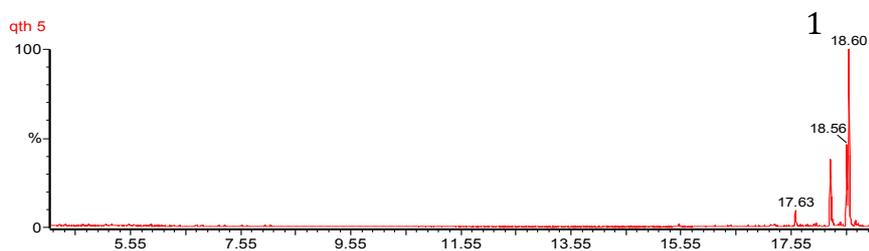
**Figura 25.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 2 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1)  $\alpha$ -Bisabolol



**Figura 26.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 3 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Mirceno, (2)  $\alpha$ -Felandreno, (3) Limoneno, (4) (*Z*)- $\beta$ -Epoxiocimeno, (5)  $\alpha$ -Bisabolol



**Figura 27.** GC/MS cromatograma correspondiente a la banda 4 del quimiotipo H con la identificación de los componentes mayoritarios.

(1) Geranil-*p*-cimeno

La cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC/MS) permitió identificar los principales compuestos que presentaban actividad antioxidante, que fueron un total de 11 entre los dos quimiotipos (QTB y QTH). Cinco del total de los 11 componentes con mayor poder antioxidante fueron coincidentes entre ambos quimiotipos siendo estos el sabineno, mirceno, linalool, limoneno y el (*Z*)- $\beta$ -epoxiocimeno. De estos cinco compuestos, el limoneno se encuentra en trazas en ambos quimiotipos, el mirceno, el sabineno y el linalool están presentes en el QTB en muy baja proporción (0,1%, tr y 0,2% respectivamente) y sin embargo son unos de los componentes mayoritarios en el QTH (16,6%, 13,8 y 4,2% respectivamente), y el (*Z*)- $\beta$ -epoxiocimeno se halla en muy baja cantidad en el QTH (0,1%) y es el compuesto principal del aceite esencial del QTB (36%). Un claro rasgo diferencial entre las bandas antioxidantes analizadas en los cromatofolios de ambos quimiotipos radica en la presencia de una banda más en el quimiotipo B que hace

referencia al acetato de crisantemilo que, además, supone un 35,4% de la composición del QTB. Este último compuesto mencionado, a pesar de encontrarse en una proporción muy elevada presenta sin embargo una actividad antioxidante relativamente baja, a juzgar por la débil intensidad de la marca mostrada en el cromatofolio (figura 16). Del resto de compuestos identificados como antioxidantes cabe destacar el  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -bisabolol y geranil-*p*-cimeno (<5%) como compuestos antioxidantes presentes en el quimiotipo húngaro. Por último el camazuleno, que sí muestra actividad antioxidante en el quimiotipo B (3,7%), no lo hace en el H. Ello puede ser debido a que en el quimiotipo H la proporción del mismo (0,2%) es muy baja de modo que su poder antioxidante (aparentemente menor que el del  $\alpha$ -bisabolol) puede ser despreciable en comparación con el de los compuestos adyacentes.

## 5. CONCLUSIONES

- 1) En el caso de los aceites esenciales de la Península Ibérica, los resultados confirman la identidad de los quimiotipos previamente señalados que concuerda con los establecidos en la bibliografía. Es importante destacar que se trata de quimiotipos exentos de tuyona, lo cual tiene un impacto relevante en cuanto a posibles aplicaciones. Con respecto al material vegetal procedente de Hungría, los resultados muestran una composición característica que viene dada por la presencia mayoritaria de  $\beta$ -tuyona, así como de hidrocarburos monoterpénicos (sabineno y mirceno principalmente).
- 2) Cabe citar también la potencialidad de la TLC para la distinción de los quimiotipos de aceites esenciales. Esto permitiría, mediante el análisis de plantas individuales, llevar a cabo el *screening* preliminar de una población para obtener de una manera rápida y económica información acerca de su variabilidad química.
- 3) La actividad antioxidante observada entra dentro del rango descrito en la bibliografía en otras especies del género *Artemisia* así como en otras muestras de la misma especie pero de distinta procedencia. Desde un punto de vista comparativo se puede afirmar que la actividad antioxidante del quimiotipo español (quimiotipo B) es sensiblemente mayor que la del quimiotipo húngaro, siendo su valor de IC50 aproximadamente la mitad que el de este último.
- 4) Como consecuencia del análisis bioautográfico realizado para cada quimiotipo, la actividad antioxidante del quimiotipo español puede atribuirse principalmente al (*Z*)-epoxiocimeno y al camazuleno. En el caso del quimiotipo procedente de Hungría la actividad antioxidante puede ser debida principalmente a la presencia de  $\alpha$ -bisabolol, el (*Z*)-epoxiocimeno y el geranil-*p*-cimeno. Cabe destacar que estos compuestos representan una pequeña proporción de la composición del aceite esencial y, sin embargo, son claramente identificados en las bandas de actividad antioxidante.
- 5) Teniendo en cuenta la elevada actividad antioxidante mostrada por los isómeros de epoxiocimeno, la evaluación de la actividad antioxidante de este compuesto podría ser interesante de cara a futuras investigaciones.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

ABAD, M.J., BEDOYA, L.M., APAZA, L. y BERMEJO, P. (2012). The *Artemisia* I. Genus: A review of Bioactive Essential Oils. *Molecules*, 17: 2542-2566.

ADAMS, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, 4ª Ed. Ed Allured Publishing Corporation, Carol Stream. Illinois. 803 pp.

ARIÑO OCHOA, A., 1999. *Variabilidad química en los aceites esenciales de Artemisia absinthium de la Península Ibérica*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, 215 pp.

BARA, S., ZARAGOZA, C. y VALDERRÁBANO J., (1999). Efecto alelopático y antihelmíntico de *Artemisia absinthium*. Servicio de Investigación Agroalimentaria. Congreso 1999 de la Sociedad Española de Malherbología. 233-240.

BARROW, G.M. (1985). *Química Física*. Ed. Reverté, S.A. Barcelona, 491 pp.

BAYKAN EREL, Ş., REZNICEK, G., ŞENOL, S.G., KARABAY YAVAŞOĞULU, N.Ü., KONYALIOĞLU, S. y ZEYBEK, A.U. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turkish Journal of Biology*, 36: 75-84.

BLAGOJEVIĆ, P., RADULOVIC, N., PALIĆ, R. y STOJANOVIĆ, G. (2006). Chemical composition of the essential oils of serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4780-4789.

BLOIS, M.S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181: 1199-1200.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. y BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28 (1): 25-30.

CHOMA, I.M. y GRZELAK, E.M. (2010). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (19): 2684-2691.

DABRIO, M.V., ALBAIGUÉS, J., CLEMENTE, A.E., GASCÓ, L., GARCÍA, J.A., GELPÍ, E. y MARTÍNEZ R. (1973). *Cromatografía de gases* (vol. II) Ed. ALHAMBRA. 223 pp.

D'ARCY, P y MALLARD, G. (2004). Automated Mass Spectral Deconvolution & Identification System (AMDIS). Technology Administration National Institute of Standards and technology (NIST).

GARCÍA-SEGURA, J.M., GAVILANES, J.G., MARTÍNEZ DEL POZO, A., MONTERO, F., OÑADERRA, M. Y VIVANCO F. (1996). *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*. Ed. SÍNTESIS, SA. Madrid. 398 pp.

GRANADOS, C., YÁÑEZ, X. y ACEVEDO, D. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Información tecnológica*, 25 (3): 718-764.

JUDZENTIENE, A., BUDIENE, J., GIRCYTE, R., MASOTTI, V. y LAFFONT-SCHWOB, I. (2012). Toxic activity and chemical composition of Lithuanian wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils. *Records of Natural Products*, 6 (2): 180-183.

KORDALI, S., CAKIR, A., MAVI, A., KILIC, H. y YILDIRIM, A. (2005). Screening of Chemical Composition and Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oils from Three Turkish Artemisia Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1408-1416.

LLORENS-MOLINA, J.A. y VACAS, S. (2015). Seasonal variations in essential oil of aerial parts and roots of an *Artemisia absinthium* L. population from a Spanish área with supramediterranean climate (Teruel, Spain). *Journal of Essential Oil Research*, 27 (5): 395-405

LLORENS-MOLINA, J.A., VACAS, S., CASTELL, V. y NÉMETH-ZÁMBORINÉ, É. (2016). Variability of essential oil composition of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) affected by plant organ. *Journal of Essential Oil Research*, 20 (10): 1-11.

LÓPEZ-LUTZ, D., ALVIANO, D.S. y KOŁODZIEJCZYK, P.P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69: 1732-1738.

MARTÍNEZ-DAMIÁN, M.T., CRUZ-ÁLVAREZ, O., BERYL COLINAS-LEÓN, M.T., RODRÍGUEZ-PÉREZ, J.E. y RAMÍREZ-RAMÍREZ, S.P. (2013). Actividad enzimática y capacidad antioxidante en menta (*Mentha piperita* L.) almacenada bajo refrigeración. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA*, 24 (1): 57-69.

MIMICA-DUKIĆ, N., BOŽIN, B., SOKOVIĆ, M., MIHAJLOVIĆ, B. y MATAVULJ, M. (2002). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Three *Mentha* Species Essential Oils. *Planta Med*, 69: 413-419.

PAL SINGH, H., MITTAL, S., KAUR, S., BATISH, D.R. y KOHLI, R.K. (2009). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. *Food Chemistry*, 114: 642-645.

POLITEO, O., JUKIC, M. y MILOS, M. (2007). Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101: 379-385.

REZAEINODEHI, A. y KHANGOLI, S. (2008). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11 (6): 946-949.

SHAROPOV, F.S., SULAIMONOVA, V.A. y SETZER, W.N. (2012). Composition of the essential oil of *Artemisia absinthium* from Tajikistan. *Records of natural products*, 6 (2): 127-134.

TOVAR DEL RÍO, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la Ecoregión cafetera*. Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira, 150 pp.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ-RUBIO, M.E., SERRANO, J., GOÑI, F. y SAURA-CALIXTO, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41: 274-285.

VALLÈS, J., GARCÍA, S., HIDALGO, O., MARTÍN, J., PELLICER, J., SANZ, M. y GARNATGE, T. (2011). Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in *Artemisia* (Asteraceae), en: *Advances in Botanical Research*, (vol. 60). Ed. Academic Press, 349-419.

VALLÈS, J. y MCARTHUR, E.D. (2001). *Artemisia* Systematics and Phylogeny: Cytogenetic and Molecular Insights. *USDA Forest Service Proceedings*, 67-74.

ZANOUSI, M.B.P., AZAR, P.A. y RAEESI, M. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of different organs of three *Artemisia* species from Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (42): 589-5494.