

## 20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### **Aceite esencial de orégano como fotoprotector del daño oxidativo producido en medios biológicos por acción de especies reactivas de oxígeno fotogeneradas.**

Dimarco Palencia, Frida C.D.; Ferrari, Gabriela V.; Montaña, M. Paulina\*

frida2988@gmail.com

Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia.

Universidad Nacional de San Luis.

---

#### **Resumen**

Los aceites esenciales constituyen una mezcla de compuestos volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, cumpliendo funciones de protección frente a enfermedades y plagas como asimismo de atracción de especies polinizadoras. También son usados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Una vez extraídos estos aceites, pueden deteriorarse debido a diversos factores ambientales y perder sus propiedades organolépticas y terapéuticas. La principal causa de descomposición de los mismos es la exposición a la luz en condiciones aeróbicas. Estas degradaciones pueden ser causadas por especies reactivas de oxígeno fotogeneradas a partir de sensibilizadores endógenos.

En este trabajo se estudió la fotodegradación del aceite esencial de orégano en presencia del sensibilizador endógeno riboflavina, para poder determinar la interacción del mismo con especies reactivas de oxígeno fotogeneradas. Además se seleccionó un sistema modelo de oxidación del aminoácido triptofano fotosensibilizado con riboflavina para conocer el posible efecto de la combinación de ambos sobre el daño oxidativo.

**Palabras clave:** aceite esencial de orégano, especies reactivas de oxígeno, riboflavina

#### **1. Introducción**

Los aceites esenciales (AE) son una mezcla de compuestos volátiles, producto

del metabolismo secundario de las plantas.

El uso de los AE ha cobrado especial importancia en la industria alimenticia

debido a la mayor conciencia de la existencia de productos naturales para la conservación de los alimentos y al crecimiento de la resistencia microbiana a los conservantes convencionales. Por ejemplo, el orégano o su aceite esencial, puede ser utilizados como conservantes naturales debido a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Milos, M. M. J. & Jerkovic I. (2000); Tsimogiannis, D. S., M. & V. Oreopoulou (2006)), permitiendo prolongar la vida útil de los alimentos.

Sin embargo, una vez extraídos estos aceites, pueden deteriorarse debido a diversos factores ambientales y perder sus propiedades organolépticas y terapéuticas. La principal causa de descomposición de los mismos es la exposición a la luz en condiciones aeróbicas (Iwanami Y. et al. (1997); Neumann M. & García, N. A. (1992)). La degradación de estos AE puede no solo comprometer sus propiedades originales, sino ser la fuente de generación de compuestos alergénicos responsables de problemas ulteriores, como dermatitis, eczemas y ulceraciones, y promover reacciones de sensibilización y reacciones oxidativas en la piel.(Hagvall L., Bäcktorp C., Norrby P. O., Karlberg A. T. & Börje A. (2011); Sköld M., Börje A., Harambasic E., & Karlberg A-T (2004)). Estas degradaciones pueden ser causadas por especies reactivas de oxígeno (EROs) fotogeneradas a partir de sensibilizadores endógenos.

El aceite esencial de orégano está compuesto principalmente por carvacrol (CR) y timol (TM), dos isómeros de posición de isopropilmetilfenol. (Bokov D.O., Morokhina S. L. & Popov D. M. (2015))

En este trabajo se estudió la fotodegradación del aceite esencial de orégano (AO) en presencia de la vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina, Rf), para poder determinar la interacción del mismo con EROs.

Además teniendo en cuenta que el AO es utilizado como conservante natural en alimentos, ambiente que comparte con Rf y proteínas, se seleccionó un sistema modelo de oxidación del aminoácido Triptofano (TRP) fotosensibilizado con Rf con la intención de conocer el posible efecto de la combinación de ambos sobre el daño oxidativo. La elección de TRP se basó en que es un aminoácido particularmente susceptible a una variedad de agentes oxidantes (Thomas A. H., Serrano M. P., Rahal V., Vicendo P., Claparols C., Oliveros E. & Lorente C.(2013))

## 2. Objetivos

- Estudiar la interacción del AO con EROs fotogeneradas.
- Analizar un posible efecto de protección por parte del AO sobre el daño oxidativo en medioambientes biológicos.
- Dilucidar los mecanismos fotoquímicos que gobiernan la reacciones antioxidativas.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Reactivos utilizados.

El aceite esencial de orégano utilizado en este trabajo fue obtenido a partir de la destilación de plantas completas de orégano cosechadas en etapa de floración, pertenecientes a la especie *Origanum vulgare*, de la familia de las *Lamiaceae*, cultivadas en el campo experimental de la FTU-UNSL. Se utilizó una técnica de hidrodestilación con trampa Clevenger.

Los principales componentes de AO, carvacrol (CR) y timol (TM), se caracterizaron por EIMS y NIST Mass Spectrometry Data Center, utilizando un equipo Varian Saturn 2000 equipado con una columna capilar Varian C.S. Además, se cuantificaron CR y TM, en el aceite extraído, mediante cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo modelo Clarus 500GC Perkin-Elmer, equipado con un detector de ionización de llama (FID). La composición de TM en el aceite de orégano ( $TM_{AO}$ ) es 47,37% p/v y la de CR, 7,14 % p/v.

Dado que TM es el componente mayoritario, las concentraciones indicadas para AO corresponden a la concentración de TM en el mismo ( $TM_{AO}$ ).

Para realizar los estudios fotosensibilizados se emplearon además los siguientes reactivos Riboflavina (Aldrich), Superóxido Dismutasa (Aldrich), Azida Sódica (Aldrich), Catalasa (Aldrich),

Furfuril Alcohol (Aldrich); Rosa de Bengala (Anedra), L-triptofano (Sigma Chem. Co.)

Como solventes se emplearon Metanol (grado HPLC Sintorgan), Metanol deuterado ( $CH_3-OD$ , Aldrich), Agua destilada y Agua deuterada ( $D_2O$ , Aldrich).

#### 3.2 Metodología empleada.

Las EROs se produjeron por fotoirradiación del sensibilizador Rf con luz de longitud de onda mayor a 400 nm, zona espectral donde los sustratos son transparentes a la radiación.

Para el estudio acerca de la cinética y mecanismos involucrados en la degradación del AO sometido a irradiación con luz visible en presencia de Rf se realizaron fotólisis en un equipo fotolizador provisto de una lámpara halógena de 150 w y filtro de corte  $\lambda > 400$  nm. Los espectros de absorbancia se registraron en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453A. Las medidas de consumo de oxígeno se llevaron a cabo usando un electrodo específico de oxígeno Orion 810+.

La constante de *quenching* total de  $O_2(^1\Delta_g)$  fue determinada mediante detección de fosforescencia resuelta en el tiempo (TRPD) usando un espectrofotómetro cinético láser, provisto con un láser de Nd:YAG Spectron. Los tiempos de vida de  $O_2(^1\Delta_g)$  se obtienen en ausencia ( $\tau_0$ ) y en presencia ( $\tau$ ) del sustrato y mediante un tratamiento de Stern-Volmer (Ecuación 1), se determina la constante cinética ( $k_i$ ). Como generador

de  $O_2(^1\Delta_g)$  se utilizó Rosa de Bengala (RB) y como solvente MeOD.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q [Q] \tau_0 \quad \text{Ec.3}$$

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_0} + k_q [Q] \tau_0 \quad \text{Ec. 1}$$

Para evaluar la constante reactiva,  $k_r$ , (reacción 13 del esquema cinético), para la reacción del sustrato con  $O_2(^1\Delta_g)$  se usó el método de Scully y Hoigné (Foote C. S. & Ching T. Y. (1975); Scully F. E. & Hoigné J. (1987)) (Ecuación 2), donde es necesario conocer la  $k_r$  para la fotooxidación de un compuesto de referencia R:

$$\frac{k_r [R]}{k_r [R] + k_q [Q]} = \frac{\tau_0 [R]}{\tau_0 [R] + \tau_0 [Q]} \quad \text{Ec.2}$$

Las pendientes se obtienen de los respectivos gráficos de la cinética de primer orden del consumo de oxígeno sensibilizado por RB en presencia del sustrato y de la referencia. La constante de velocidad de la referencia furfural alcohol (FFA) es  $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . (Massad W., Bertolotti S.G., Romero M., Garcia N.A.(2005))

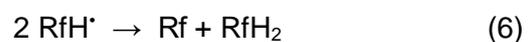
Para las experiencias de fluorescencia estacionaria se utilizó un Espectrofluorómetro Fluoromax-4 Horiba Jobin-Yvon y celdas de fluorescencia de 1 cm de camino óptico. Se realizó un tratamiento de Stern-Volmer con los datos obtenidos (Ecuación 3), siendo  $I$  e  $I_0$  las intensidades de fluorescencia de Rf en presencia y en ausencia de los sustratos bajo estudio, respectivamente.

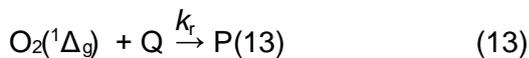
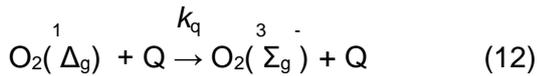
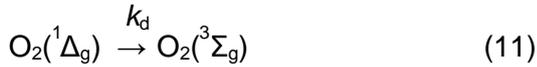
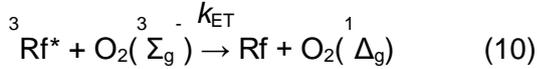
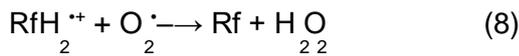
siendo  $\tau_0 = \tau_0^0 \tau_{(1)}$ , la constante de Stern-Volmer.  $\tau_0^0$  es el valor del tiempo de vida del estado singulete del sensibilizador en ausencia del *quencher*, el cual tiene un valor de 5,6 ns (Ferrari G. V., Natera J., Montaña M. P., Muñoz V., Gutierrez E. L., Massad W., Miskoski S. & García N. A. (2015).)  $\tau_{(1)}$  es la constante de desactivación del estado singulete de Rf (reacción 2 del Esquema 1.)

La constante  $k_{(3)}$ , correspondiente a la velocidad de desactivación de  $^3Rf^*$  (reacción 4 del Esquema 1.), puede ser evaluada midiendo las variaciones en los tiempos de vida de esta especie mediante la técnica de Láser Flash Fotólisis descrita anteriormente, en presencia ( $[Q]$ ) y ausencia ( $[Q]^0$ ) de Q aplicando un tratamiento de Stern – Volmer.

#### 4. Resultados y Discusión

El esquema 1 describe las diferentes reacciones fotoquímicas que pueden tener lugar en este sistema.



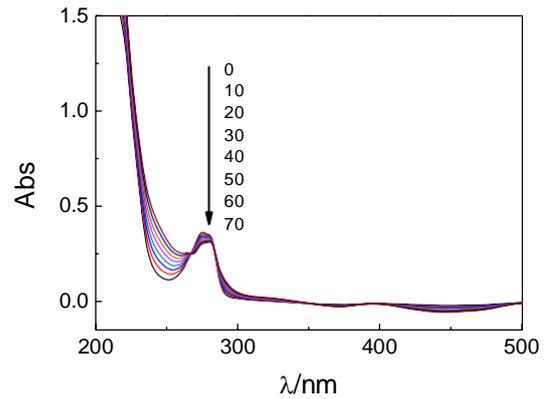


Siendo:  $k_t = k_r + k_q$

**Esquema 1.** Mecanismo cinético de Riboflavina (Rf) como sensibilizador en presencia de un donador de electrones (Q) y de oxígeno ( $\text{O}_2$ ).

#### 4.1. Interacción con especies fotoexcitadas de Rf.

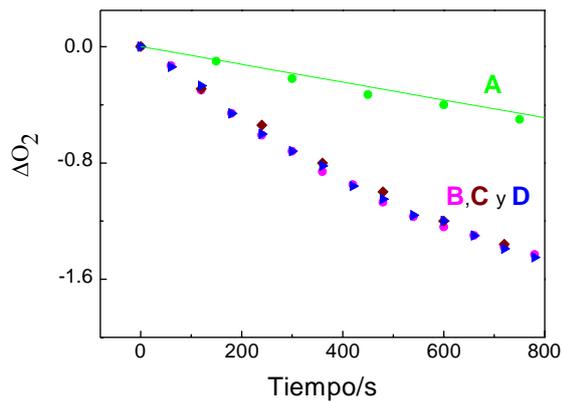
La fotoirradiación de soluciones metanólicas de Rf + AO en condiciones donde solo la vitamina absorbe radiación, produce los cambios espectrales que se muestran en la Figura 1. Estos cambios indican el desarrollo de fotorreacciones que incluyen al sustrato y al fotosensibilizador.



**Figura 1.** Evolución espectral de la mezcla 0,04 mM Rf + 0,2 mM  $\text{TMAO}$  bajo irradiación a  $\lambda > 400$  nm en medio metanólico. Los números en la figura representan el tiempo en segundos.

#### 4.2. Desactivación de EROs fotogeneradas.

En orden a conocer las distintas EROs fotogeneradas por Rf que degradan el sustrato bajo estudio, se realizaron experiencias de consumo de  $\text{O}_2$  en presencia de sequestradores específicos de EROs como  $\text{NaN}_3$  (2mM) *quencher* específico de  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , la enzima SOD que dismuta a  $\text{O}_2^{*-}$  (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), también CAT que descompone  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y manitol que desactiva las especies  $\text{OH}^\cdot$  (10mM). Los perfiles de consumo de  $\text{O}_2$  se muestran en la Figura 2.

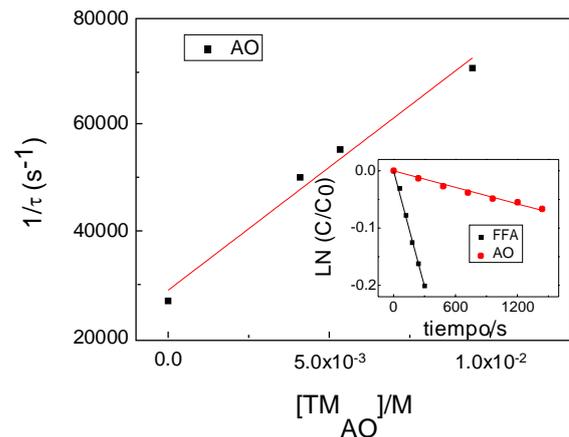


**Figura 2.** Perfiles de consumo de oxígeno en presencia de inhibidores específicos de EROs, en soluciones metanólicas: A) Rf (0,04 mM)+  $TM_{AO}$  (0,2 mM)+ Azida de Sodio (5 mM); B) Rf (0,04 mM)+  $TM_{AO}$  (0,2 mM)+ Catalasa (1  $\mu$ g/mL); C) Rf (0,04 mM)+  $TM_{AO}$  (0,2 mM)+ SOD (1  $\mu$ g/mL); D) Rf (0,04 mM)+  $TM_{AO}$  (0,2 mM).

#### 4.3. Desactivación de $O_2(^1\Delta_g)$ .

Observando los resultados de la sección anterior podemos inferir que  $O_2(^1\Delta_g)$  es el principal responsable de la fotodegradación de AO. Para estudiar esta interacción, se determinó por un lado, la constante de velocidad total de desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $k_t$ . Las representaciones de Stern-Volmer se muestran en la Figura 3. El valor de  $k_t$  obtenido fue de  $4,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Seguidamente se determinó la constante reactiva de desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$ ,  $k_r$ . Los resultados se muestran en la Figura 3, inset. La  $k_r$  obtenida fue  $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$



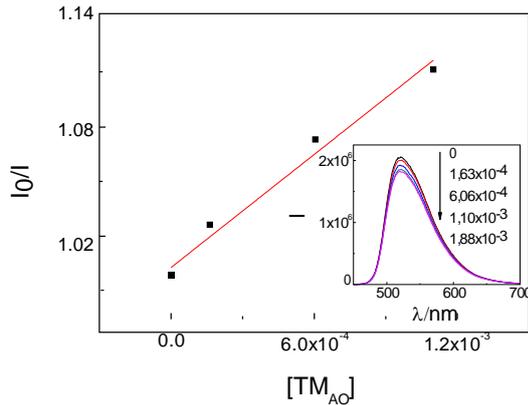
**Figure 3.** Representación gráfica de Stern – Volmer para la desactivación de  $O_2(^1\Delta_g)$  por  $TM_{AO}$ . **Inserto:** Representación de perfiles de consumo de oxígeno de primer orden en medio metanólico para RB +  $TM_{AO}$  (0,2 mM).

#### 4.4. Desactivación de los estados excitados de Rf.

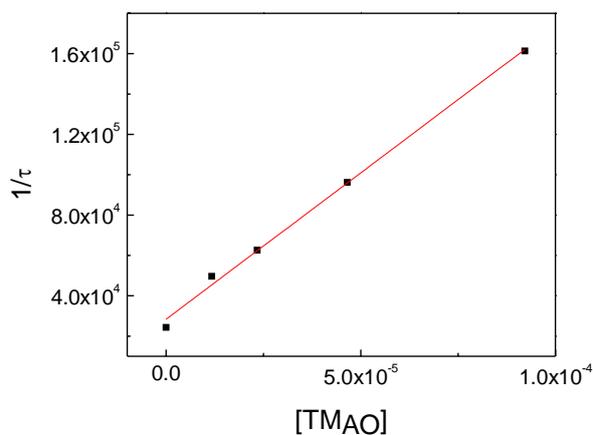
Rf presenta una intensa banda de emisión fluorescente centrada en 515 nm y un rendimiento cuántico de 0,25. En presencia del AO en concentraciones mayores a  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , el *quenching* de fluorescencia desde el estado excitado singulete de Rf ( $^1Rf^*$ ) produce la disminución en la intensidad de emisión estacionaria pero la forma del espectro no cambia.

Evaluamos el proceso de desactivación de  $^1Rf^*$  por el AO de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2. Mediante un tratamiento de Stern-Volmer (Ec. 3) se evaluó la constante de desactivación de este proceso dando un valor de

$$k_{q(1)} = 1,74 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}. \text{ (Figura 4)}$$



**Figura 4.** Gráfico de Stern-Volmer para el quenching de fluorescencia de Riboflavina en medio metanólico por AO. **Inserto:** Emisión de fluorescencia de soluciones de Rf en MeOH/H<sub>2</sub>O 60/40, en presencia de concentraciones crecientes de AO. Además, se evaluó la desactivación del estado triplete excitado de Rf (<sup>3</sup>Rf\*). La velocidad de fotodescomposición del <sup>3</sup>Rf\* fue monitoreada a través de las variaciones en los tiempos de vida de esta especie mediante la técnica de Láser Flash Fotólisis (Figura 5). El valor determinado de  $k_{(3)} = 1,45 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

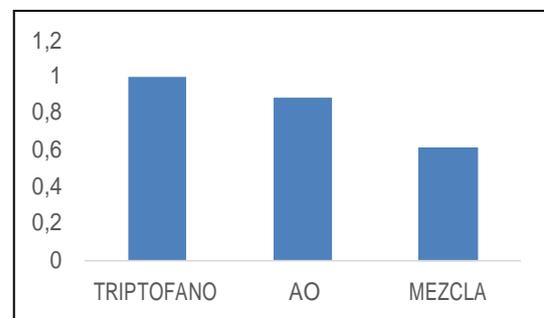


**Figura 5.** Gráfico de Stern-Volmer para el quenching de <sup>3</sup>Rf\* de Riboflavina por AO en medio 60/40 MeOH/H<sub>2</sub>O.

#### 4.5. AO como fotoprotector de TRP

La velocidad de consumo de O<sub>2</sub> en sistemas donde está presente un aminoácido modelo nos provee información para entender la protección del AO hacia residuos proteínicos a través de oxidación fotopromovida. Sabemos por bibliografía que TRP posee un valor de  $k_f = 7,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y una  $k_r = 4,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . (Criado S., Bertolotti S. G. & García N. A. (1996).)

Los resultados se muestran en la Figura 6. Como puede observarse, la velocidad de consumo de O<sub>2</sub> de TRP en presencia del AO es menor que la velocidad individual de este sustrato, lo cual indicaría que el AO podría tener un efecto protector del aminoácido en las condiciones ensayadas.



**Figura 6.** Velocidad de consumo de O<sub>2</sub> con soluciones aireadas de MeOH/H<sub>2</sub>O 60:40 v/v con filtro  $\lambda > 400 \text{ nm}$  de: **MEZCLA:** 0,04 mM de Rf + 0,02 mM TMAO + 0,02 TRP; **AO:** 0,04 mM de Rf + 0,02 mM TMAO; **TRIPTOFANO:** 0,04 mM de Rf + 0,02 mM TRP.

#### 5. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, las EROs fotogeneradas por sensibilización, principalmente  $O_2(^1\Delta_g)$ , reaccionan con el AO degradándolo. La relación de  $k_f/k_t$  da un valor de 0,5; lo que indica que el proceso de desactivación de esta especie ocurre simultáneamente por una vía química y una física.

Si bien el AO desactiva el  $^1Rf^*$ , las concentraciones necesarias para lograrlo son superiores a las utilizadas en este trabajo.

El valor de la constante de desactivación del  $^3Rf^*$  por el AO justificaría la ausencia de especies como  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ .

Asimismo es posible inferir que el AO ejercería un efecto protector del aminoácido modelo usado en el presente estudio.

### Bibliografía

Bokov D.O., Morokhina S. L. & Popov D. M. (2015). Phytochemical study of essential oil from turkish oregano (*Origanum Onites L.*) by gas chromatography/mass spectrometry. Pharm. Chem. J. 49: 44-61.

Criado S., Bertolotti S. G. & García N. A. (1996). Kinetic aspects of the rose bengal-sensitized photo-oxygenation of tryptophan alkyl esters. Ground state and photopromoted dye-tryptophan derivative interactions. J. Photochem. Photobiol. B: Biology 34: 79-86

Ferrari G. V., Natera J. , Montaña M. P. , Muñoz V., Gutierrez E. L. , Massad W.,

Miskoski S. & García N. A. (2015). Scavenging of photogenerated ROS by Oxicams. Possible biological and environmental implications. J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 153: 233-239.

Foote C. S. & Ching T. Y. (1975). Chemistry of singlet oxygen. XXI. Kinetics of bilirubin photooxygenation, J. Am. Chem. Soc. 21: 6209-6214.

Hagvall L., Bäcktorp C., Norrby P. O., Karlberg A. T. & Börje A. (2011) Experimental and theoretical investigations of the autoxidation of geraniol: a dioxolane hydroperoxide identified as a skin sensitizer. Chem. Res. Toxicol. 24, 1507.

Iwanami, Y., Tateba, H., Kodama, N., Kishino, K (1997). Changes of Lemon Flavor Components in an Aqueous Solution during UV Irradiation. J. Agric. Food Chem. 45: 463–466. .

Massad W., Bertolotti S.G., Romero M., Garcia N.A.(2005). A kinetic study on the inhibitory action of sympathomimetic drugs towards photogenerated oxygen active species. The case of phenylephrine, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 80: 130-138.

Milos, M. M. J. & Jerkovic I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare L. ssp hirtum*) Food Chemistry 71: 79-83.

Neumann M. & García, N. A. (1992). Kinetics and mechanism of the light-induced deterioration of lemon oil. *J. Agric. Food Chem.* 40: 957–960.

Scully F. E. & Hoigné J. (1987). Rate constants for reactions of singlet oxygen with phenols and other compounds in water, *Chemosphere* 4: 681-694.

Sköld M., Börje A., Harambasic E., & Karlberg A-T (2004). Contact Allergens Formed on Air Exposure of Linalool. Identification and Quantification of Primary and Secondary Oxidation Products and the Effect on Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (12), 1697-1705.

Thomas A. H., Serrano M. P., Rahal V., Vicendo P., Claparols C., Oliveros E. & Lorente C.(2013). Tryptophan oxidation photosensitized by pterin. *J. Free Radical Biology and Medicine.* 63,467-475.

Tsimogiannis, D. S., M. & V. Oreopoulou (2006). Isolation and characterization of antioxidant components from oregano (*Origanum heracleoticum*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 41: 39-48.

### **Financiamiento**

El presente trabajo se realizó con los fondos provenientes del Proyecto de Investigación Consolidado N° 2-2714-U.N.S.L. - 22Q/409 SCyT – UNSL.